

Aus der Klinik für Allgemeine, Unfall-, Hand- und Plastische Chirurgie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. W. Mutschler

Handchirurgie, Plastische Chirurgie und Ästhetische Chirurgie  
Chefarzt: Univ.-Prof. Dr. med. R. Giunta

**Verbesserte Nervenregeneration durch adenovirale Gentherapie  
mit VEGF<sub>165</sub> im Modell der geburtstraumatischen  
Plexusparese an der Ratte**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Matthias Hillenbrand

aus  
Düsseldorf

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. R. Giunta

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Florian Heinen  
Priv.-Doz. Dr. med. Joachim Schessl

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Priv.-Doz. Dr. med. T. Holzbach

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2014



---

Meiner Familie

---

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	8
1.1 Übersicht.....	8
1.2 Plexus brachialis.....	9
1.2.1 Übersicht der Anatomie .....	9
1.1.1 Traumata und Nervenregeneration .....	11
1.3 Geburtstraumatische Plexusparese.....	14
1.3.1 Epidemiologie und Formen .....	14
1.3.2 Sensomotorische Ausfälle und Genesung .....	16
1.4 Therapieansätze der geburtstraumatischen Plexusparese .....	18
1.4.1 Konservative Behandlung .....	18
1.4.2 Primäre operative Rekonstruktion des Plexus brachialis .....	19
1.4.2.1 Anatomische Rekonstruktion.....	19
1.4.2.2 Extraanatomische Rekonstruktion.....	20
1.4.2.3 Problematik des Zeitpunkts einer primären Operation .....	21
1.4.3 Sekundäre motorische Ersatzoperationen durch Muskeltransfer.....	22
1.4.4 Mögliche Ansätze molekularer Therapie .....	25
1.5 Einsatz von VEGF zur verbesserten Nervenregeneration.....	27
1.5.1 VEGF und Angiogenese.....	27
1.5.2 Protektiver Effekt von VEGF auf $\alpha$ -Motoneurone im Rückenmark.....	31
1.6 Gentherapie mit VEGF .....	33
1.6.1 Applikationsmethoden für VEGF .....	33
1.6.2 AdVEGF in präklinischen und klinischen Studien .....	39
1.6.3 Einsatz von AdVEGF im Modell der geburtstraumatischen Parese des Plexus brachialis der Ratte .....	41
1.7 Zielsetzung .....	42

---

2. Material und Methoden .....	43
2.1 Geburtstraumatische Parese des Plexus brachialis der Ratte .....	43
2.1.1 Versuchsaufbau .....	43
2.1.2 Tiere und Tierhaltung .....	43
2.1.3 Operation.....	44
2.2 Gentherapie mit AdCMV.VEGF <sub>165</sub> am operierten Modell .....	45
2.2.1 Kultivierung und Gewinnung von AdCMV.VEGF <sub>165</sub> .....	45
2.2.2 Injektionsmodell.....	46
2.3 Verhaltensuntersuchungen.....	47
2.3.1 Übersicht und Bewegungseinschränkungen .....	47
2.3.2 Grid-Walk-Test .....	48
2.3.3 Hebe-Test.....	48
2.3.4 Grooming-Test .....	48
2.4 Untersuchung des M. deltoideus .....	49
2.4.1 Gewebeentnahme .....	49
2.4.2 Gewichtsbestimmung .....	50
2.4.3 Histologische Untersuchung.....	50
2.5 Untersuchung des Plexus brachialis.....	53
2.5.1 Gewebeentnahme .....	53
2.5.2 Histologische Untersuchung.....	54
2.5.3 Quantifizierung der VEGF-Expression durch Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	56
2.6 Untersuchung des Rückenmarks.....	58
2.6.1 Gewebeentnahme .....	58
2.6.2 Histologische Untersuchung.....	59
2.6.3 Färbung mit Anti-CGRP Antikörpern .....	60
2.7 Statistische Auswertung .....	63

---

3. Ergebnisse .....	64
3.1 Titerbestimmung und Verifizierung von AdCMV.VEGF <sub>165</sub> .....	64
3.2 Verhaltensuntersuchungen .....	65
3.2.1 Grid-Walk-Test .....	65
3.2.2 Hebe-Test.....	67
3.2.3 Grooming-Test .....	71
3.3 Untersuchung des M. deltoideus .....	73
3.3.1 Gewichtsbestimmung .....	73
3.3.2 Histologische Untersuchung.....	76
3.4 Untersuchung des Plexus brachialis.....	82
3.4.1 Histologische Untersuchung.....	82
3.4.2 Quantifizierung der VEGF-Expression durch Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	88
3.5 Untersuchung des Rückenmarks.....	91
3.5.1 Zählung der $\alpha$ -Motoneurone.....	91
4. Diskussion.....	95
4.1 Steigerung der VEGF-Expression durch AdCMV.VEGF <sub>165</sub> .....	96
4.2 Effekt der VEGF-Therapie auf funktioneller Ebene .....	97
4.3 VEGF und Nervenregeneration .....	101
4.4 Einfluss von VEGF auf das Überleben von Motoneuronen .....	104
4.5 AdVEGF <sub>165</sub> als ergänzende Therapie bei der geburtstraumatischen Plexusparese .....	105
4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick.....	109

---

5. Zusammenfassung .....	111
6. Literaturverzeichnis.....	113
7. Anhang.....	124
7.1 Chemikalien und Puffer .....	124
7.2 Antikörper und Reagenz-Kits.....	125
7.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	125
7.4 Pharmaka und Tiernahrung.....	126
7.5 Software.....	126
8. Abbildungsverzeichnis .....	127
9. Tabellenverzeichnis .....	130
10. Abkürzungsverzeichnis .....	132
11. Danksagung.....	136

# 1. Einleitung

## 1.1 Übersicht

Die Therapie bei Verletzungen peripherer Nerven beschränkt sich bisher auf die chirurgische Wiederherstellung der neuronalen Kontinuität. Trotz eines besseren Verständnisses über die Pathophysiologie von Nervenverletzungen und Fortschritten mikrochirurgischer Rekonstruktionsverfahren, stellt die operative Therapie stets eine Herausforderung dar. Neben der chirurgischen Behandlung von Verletzungen peripherer Nerven könnte die molekularbiologische Therapie eine ergänzende Methode für eine verbesserte Nervenregeneration darstellen. Dabei steht die Applikation physiologisch wirksamer Wachstumsfaktoren in das den Schaden umgebende Gewebe im Vordergrund.<sup>109</sup> Das Ziel der vorliegenden Arbeit soll sein, Strategien zu entwickeln, die komplementär zur chirurgischen Behandlung das Ergebnis und die Prognose der Therapie peripherer Nervenverletzungen verbessern.

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist einer dieser Wachstumsfaktoren, der im Rahmen einer molekularbiologischen Therapie von großer Bedeutung ist. Der Schwerpunkt der medizinischen Forschung zum therapeutischen Einsatz von VEGF beruht größtenteils auf der Beeinflussung der Angiogenese. Abhängig vom Ziel der Therapie kann neben der Induktion einer Angiogenese auch die Blockade dieser angestrebt werden. Bei vielen Krankheiten spielt die ungezielte Neovaskularisation durch eine vermehrte Synthese von VEGF eine große Rolle. Diese führt bei der diabetischen Retinopathie zur kontinuierlichen Schädigung der Netzhaut und hat häufig eine Erblindung des Auges zur Folge.<sup>3</sup> Ebenso wird durch die unkontrollierte Synthese von VEGF die Gefäßneubildung in Tumoren stimuliert, wodurch dessen Wachstum gefördert wird und gleichzeitig neue Gefäße als potentielle Metastasierungswege zur Verfügung stehen.<sup>44</sup> Therapieansätze in der Behandlung dieser Krankheiten liegen in der gezielten Blockade der durch VEGF induzierten Angiogenese. Andererseits kann eine insuffiziente Gefäßversorgung Ischämien in Herz oder Gehirn verursachen und ist Grundlage vieler anderer Erkrankungen. In diesen Fällen wäre eine therapeutische Induktion der Angiogenese

---

vorteilhaft. Diese kann auch in der Plastischen Chirurgie wünschenswert sein. So kann eine durch VEGF stimulierte Gefäßneubildung zu einer Erhöhung der Überlebensrate von Hautlappenplastiken führen.<sup>52</sup>

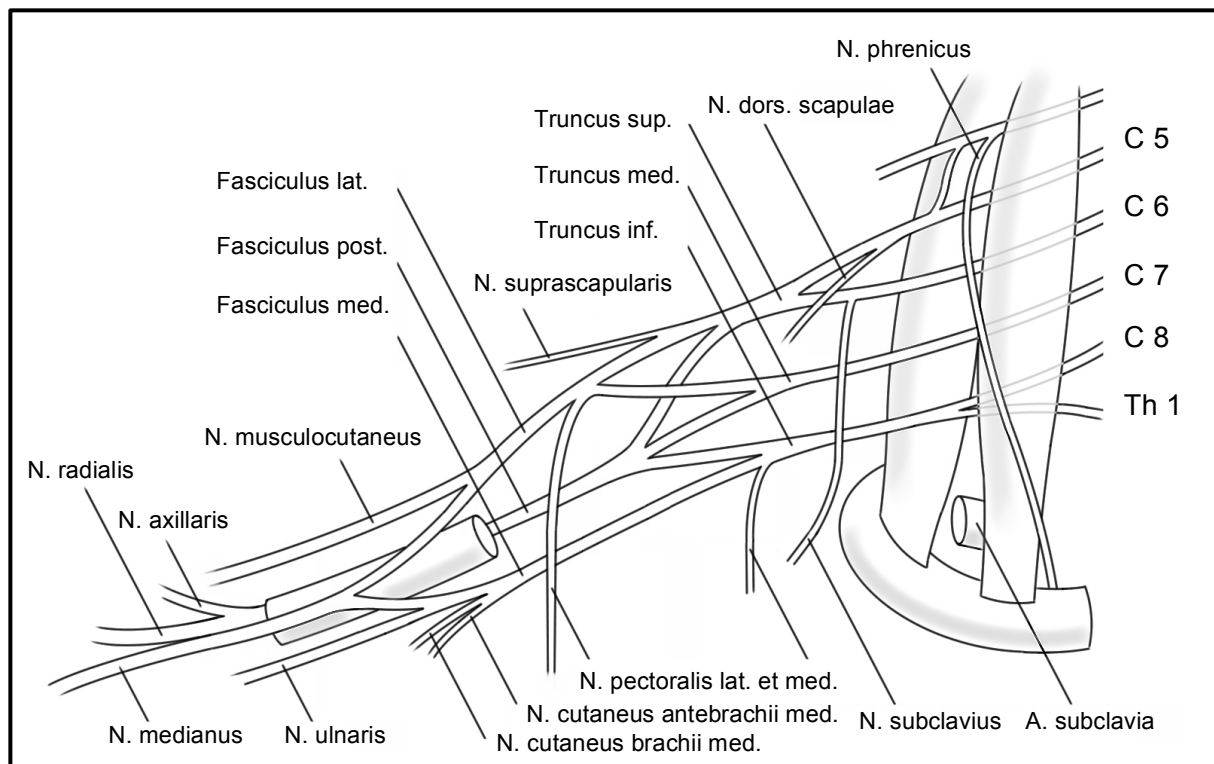
Die geburtstraumatische Parese des Plexus brachialis stellt bislang eine Verletzung dar, die lediglich durch eine operative Rekonstruktion der peripheren Nerven therapiert werden konnte. Zusätzlich zum Schaden am Plexus brachialis selbst kommt es außerdem zu einem Verlust der entsprechenden Motoneurone im Rückenmark.<sup>73</sup> VEGF hat als Wachstumsfaktor in der Angiogenese ebenfalls einen direkten Einfluss auf die Nervenregeneration.<sup>112</sup> Dies wird nicht nur durch seine neurotrophen Eigenschaften selbst, sondern gleichzeitig durch angiogenetische Effekte vermittelt, die eine verbesserte Perfusion der verletzten Nerven gewährleisten.<sup>130</sup> Darüber hinaus konnte ein protektiver Effekt auf Motoneurone im Rückenmark nachgewiesen werden.<sup>69</sup> Durch den Einsatz von VEGF könnte eine verbesserte Nervenregeneration mit einer Verkürzung der Heilungszeit erreicht und gleichzeitig die Notwendigkeit chirurgischer Interventionen reduziert werden. Zugleich könnte durch die Protektion der Motoneurone die fortschreitende und später irreversible Parese des Plexus brachialis aufgehalten werden. Diese Kenntnisse geben Anlass, die Wirksamkeit von VEGF auf die Regeneration peripherer Nerven sowie die Protektion der entsprechenden Motoneurone im Rückenmark im Rahmen eines Modells der geburtstraumatischen Plexusparese zu prüfen.

## 1.2 Plexus brachialis

### 1.2.1 Übersicht der Anatomie

Der Plexus brachialis bildet sich aus den ventralen Ästen der Spinalnerven der Segmente C5-Th1, sowie kleineren Bündeln aus C4 und Th2 (Abb. 1). Die Anteile, die zwischen der Wirbelsäule und der unteren Fläche der Klavikula verlaufen, werden topographisch als Pars supraclavicularis, der in die Achselhöhle eintretende Anteil als Pars infraclavicularis bezeichnet. Zusammen mit der A. subclavia tritt der Plexus brachialis durch die hintere Skalenuslücke. Anschließend formieren sich die

Spinalnerven zu drei Trunci, die sich jeweils in einen ventralen und einen dorsalen Ast aufspalten. Truncus superior erhält Fasern aus C5 und C6 mit kleinen Bündeln aus C4, Truncus medius aus C7 und Truncus inferior aus C8 und Th1 mit kleinen Bündeln aus Th2. Unterhalb der Klavikula gruppieren sich die Trunci in drei Fasciculi, wobei sich die dorsalen Äste zum Fasciculus posterior zusammenschließen, während die ventralen Äste den Fasciculus lateralis oben und den Fasciculus medialis unten bilden. Aus der Pars supraclavicularis des Plexus brachialis zweigen Äste zur Schulter und zur Brustwand ab. Über die Anteile der Pars infraclavicularis gehen aus den Faszikeln die Nerven des Arms hervor.

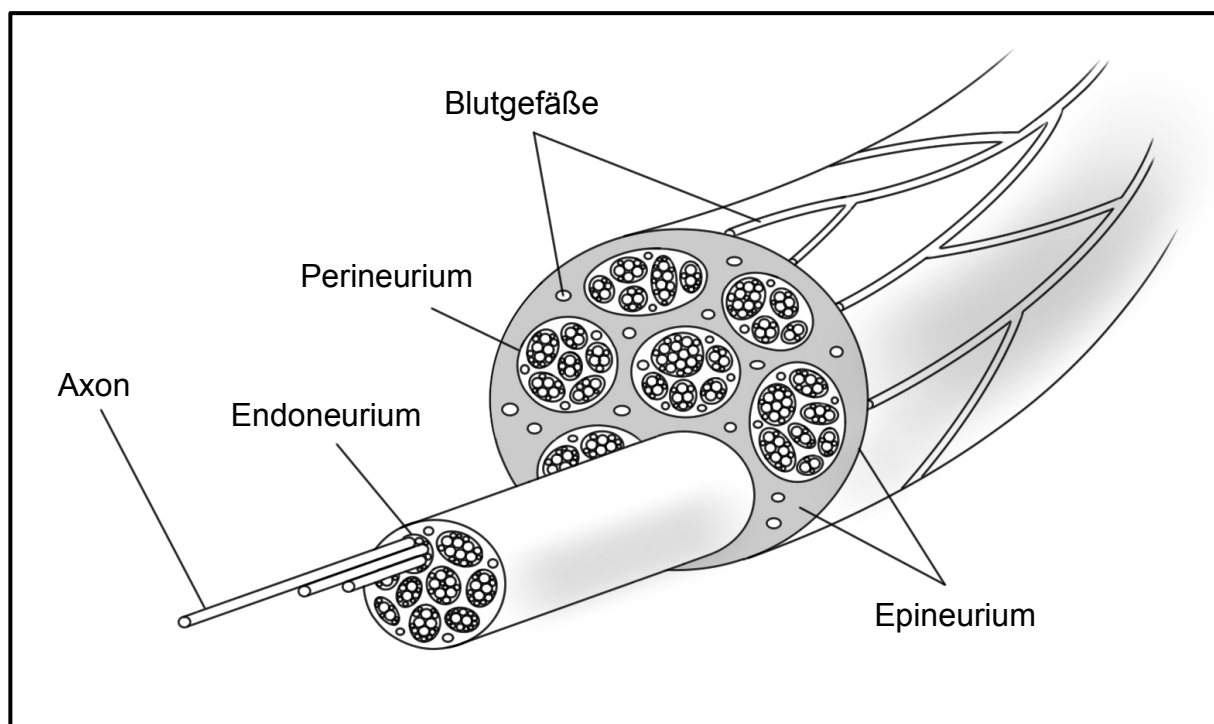


**Abb. 1** Aufbau des Plexus brachialis (modifiziert nach Carter 1858)

Periphere Nervenfasern verlaufen in Hüllstrukturen aus Bindegewebe, die aus drei aufeinander lagernden Schichten bestehen (Abb. 2). Das Endoneurium als innerste Schicht besteht aus kollagenen und retikulären Fasern und bettet die Axone ein. Das Perineurium fasst die Nervenfasern mit dem dazugehörigen Endoneurium zu Nervenfaserbündeln zusammen. Es besteht aus mehreren Schichten epithelial angeordneter Zellen, die eine Diffusionsbarriere zwischen Endoneurium und epineuralem Bindegewebe bilden. Zwischen den vom Perineurium umhüllten



Nervenfaserbündeln liegen Kollagenfasern. Als äußere Schicht fasst das Epineurium die vom Perineurium umgebenden Nervenfaserbündel zum Nerven zusammen. Die in allen Schichten spiralg verlaufenden Kollagenfasern erlauben gegenseitige Verschiebung der Nervenfaserbündel, lassen eine geringe Verlängerung zu und steuern gleichzeitig einer Überdehnung entgegen. Dieser Aufbau gewährleistet Elastizität und Zugfestigkeit der Nervenfaserbündel und verleiht die Fähigkeit zum Widerstand gegenüber Traktion und Schutz vor Kompression.<sup>116</sup> Die Gefäßversorgung peripherer Nerven erfolgt durch ein komplexes Geflecht von Gefäßen, die entlang der einzelnen bindegewebigen Hüllstrukturen verlaufen und in der Querachse des Nerven verbunden sind. Die Perfusion verläuft vom epineuralen Gefäßplexus aus ins Innere der Nervenfaser bis schließlich durch das Endoneurium zu den Axonen.



**Abb. 2** Aufbau eines peripheren Nerven im Querschnitt (modifiziert nach Lundborg 1988)

### 1.1.1 Traumata und Nervenregeneration

Die Ursache von Traumata des Plexus brachialis ist vielfältig. Die unterschiedlichen äußeren Gewalteinwirkungen können zu Überdehnungen oder Abrissen der Nerven und im ungünstigsten Fall zu Ausrissen der Nervenwurzeln aus dem Rückenmark

führen. Je nach Art der Verletzung verläuft die Regeneration der Nerven unterschiedlich. Die Nerven des Plexus brachialis sind die am häufigsten verletzten peripheren Nerven durch Fehllagerungen während Operationen. Durch dabei entstehende Überdehnungen der Nerven mit Überforderung der elastischen Widerstände sowie Druckschädigungen kann es zu einer vorübergehenden Parese des Arms kommen. Bei dieser Form der Verletzung kann durch anschließende konservative Therapie eine komplette Remission erreicht werden.<sup>72</sup> Häufige Verletzungen des Plexus brachialis beim Erwachsenen entstehen durch Hochgeschwindigkeitstraumata bei Verkehrsunfällen. Andere Ursachen stellen Schuss- und Stichwunden dar.<sup>113</sup> Die dabei entstehenden Abrissverletzungen führen, wenn überhaupt, nur zögerlich zu einer Erholung der Nerven. Im Fall von Avulsionsverletzungen und somit dem Ausriss der Nervenwurzel aus dem Rückenmark besteht keine Chance einer Restitution.<sup>19</sup> Eine besondere Form stellt die geburtstraumatische Parese des Plexus brachialis des Neugeborenen dar. Hier liegen häufig Kombinationsverletzungen aus Überdehnung und Abriss der Nerven vor.

Diese äußeren Gewalteinwirkungen auf den Plexus brachialis führen zu unterschiedlich ausgeprägten mikroskopischen Schädigungen der peripheren Nervenfasern. Die bereits verdeutlichte Mikrostruktur der Nerven bildet die Grundlage für eine Klassifikation von Nervenverletzungen in fünf Schweregrade, die jeweils durch eine klar definierte Pathologie und klinische Merkmale charakterisiert sind (Tab. 1). Die Art der Verletzung und die dadurch hervorgerufenen Veränderungen der Nervenstruktur bestimmen das Ergebnis der Regeneration.<sup>116</sup>

Seddon	Sunderland	Pathologie
Neurapraxie	Grad 1	axonale Kontinuität erhalten
Axonotmesis	Grad 2	Verlust axonaler Kontinuität mit Erhalt der Hüllstrukturen
	Grad 3	Verlust axonaler Kontinuität mit Schaden des Endoneuriums
	Grad 4	Verlust axonaler Kontinuität mit Schaden von Endoneurium und Perineurium
Neurotmesis	Grad 5	vollständiger Verlust der Kontinuität der Nervenfaser

**Tab. 1** Klassifikation und Pathologie der Verletzungen peripherer Nerven nach Seddon und Sunderland

---

In der Einteilung nach Seddon wird eine Verletzung des Nervs mit Erhalt axonaler Kontinuität als Neurapraxie bezeichnet. In diesem Fall sind ausschließlich die Myelinscheiden von den Schädigungen betroffen. Bei einer Axonotmesis ist es zum Verlust axonaler Kontinuität bei unterschiedlich stark ausgeprägten Verletzungen der Hüllstrukturen gekommen. Die Neurotmesis beschreibt letztlich den vollständigen Verlust der Kontinuität eines Nervs.<sup>108</sup>

Die Neurapraxie wird von Sunderland als Grad 1 klassifiziert und gewährleistet aufgrund unverletzter Axone eine vollständige Regeneration. Das Ausmaß der Axonotmesis, bei der es zum Verlust axonaler Kontinuität gekommen ist, reicht von intakten Hüllstrukturen bei Grad 2 bis hin zum Verlust von Endoneurium bei Grad 3 zuzüglich des Perineuriums bei Grad 4. Distal der Verletzung führt die Waller-Degeneration zum Verlust der Axone des peripheren Nervs. Je mehr Hüllstrukturen der Nervenfasern erhalten bleiben, desto günstiger verläuft in diesem Fall die Regeneration. Trotz auftretender Denervation des Endorgans durch die vorübergehende Unterbrechung axonaler Kontinuität, kommt es bei Grad 2 aufgrund intakter Hüllstrukturen zu vollständiger Regeneration der Nervenfasern. Grundlegend dafür dient das Endoneurium als Gerüst, dass die Aussprossung der Axone zum Zielorgan leitet. Durch den Verlust von Hüllstrukturen bei Grad 3 und 4 kann es durch Narbenbildung des Bindegewebes zu fibrotischen Blockaden innerhalb der Nervenfasern kommen, die eine geordnete Aussprossung und somit die Regeneration behindern bis unmöglich machen. Die Verletzung bei Grad 4 erfordert bereits eine Exzision des zerstörten Segments mit anschließender Nervenreparatur um eine mögliche Reinnervation des Endorgans gewährleisten zu können. Bei einer Verletzung vom Grad 5 besteht ohne chirurgische Intervention kaum die Möglichkeit einer spontanen Regeneration.<sup>117</sup> Von entscheidender Bedeutung für die Regeneration ist neben dem Erhalt von Hüllstrukturen ebenso die durch die Verletzung hervorgerufene Perfusionseinschränkung des Nervs. Durch zahlreiche experimentelle und klinische Studien konnte bereits bewiesen werden, dass die Blutzufuhr zum peripheren Nerv eine entscheidende Rolle für das Überleben und die funktionelle Integrität der Axone spielt.<sup>116</sup>

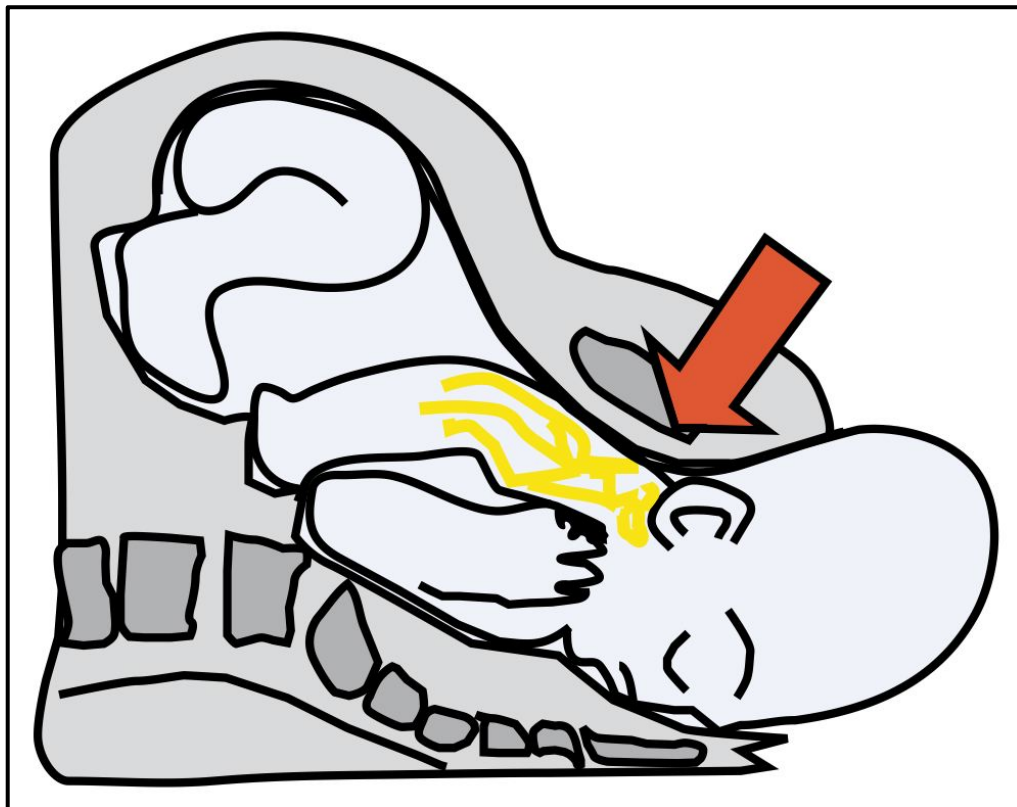
Die Grundlage dieser Arbeit basiert auf einem Quetschtrauma der peripheren Nerven des Plexus brachialis am Modell der Ratte. Neben der dabei entstehenden Kompression unmittelbar auf den Nerv, kommt es parallel zu einer Ischämie durch die gleichzeitige Kompression der Gefäße, die den Nerv versorgen. Schon eine kurzfristige Kompression ruft die klinische Symptomatik einer Parese hervor, die aber schon nach wenigen Stunden reversibel ist.<sup>70</sup> Mikroskopische Schädigungen der Nerven treten dabei nicht auf. Bei stärkeren Kompressionen scheint die Ischämie neben der direkten Schädigung des Nervs jedoch vernachlässigbar zu sein. In diesem Fall steht die mikroskopische Degeneration des Nervs im Vordergrund.<sup>88</sup> Trotzdem ist die rasche Reperfusion der ebenfalls geschädigten Gefäße von entscheidender Bedeutung für das Überleben und die anschließende Regeneration des Nervs.<sup>116</sup> Ein innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt durchgeführtes Quetschtrauma der Wurzeln C5 und C6 des Plexus brachialis soll in dieser Arbeit den Schaden einer geburtstraumatischen Parese am Modell der Ratte darstellen. Dieses Krankheitsbild dient als Ausgangspunkt zur Untersuchung der Nervenregeneration.

### 1.3 Geburtstraumatische Plexusparese

#### 1.3.1 Epidemiologie und Formen

Die geburtstraumatische Parese des Plexus brachialis tritt in Abhängigkeit vom Geburtsgewicht mit einer Inzidenz von 0,9-2,6 pro 1000 Geburten auf.<sup>100</sup> Eine Studie in den vereinigten Staaten konnte keinen Rückgang der Inzidenz in einem Zeitraum von 10 Jahren feststellen.<sup>54</sup> In Schweden hingegen konnte in entsprechend langem Zeitraum eine Erhöhung von Neuerkrankungen nachgewiesen werden.<sup>81</sup> Zu dieser Komplikation kommt es meist bei makrosomen Kindern diabetischer Mütter.<sup>7</sup> Es besteht eine mangelnde Anpassung des kindlichen Schultergürtels an das mütterliche Becken. Durch Größenmissverhältnisse von Kindskopf und Becken besteht die Gefahr einer Schulterdystokie mit Geburtsstillstand (Abb. 3). Diese Situation stellt einen geburtshilflichen Notfall dar, der aufgrund zeitgleicher Hypoxie des Kindes sofortiges Handeln erfordert. Der ungünstige Höhenstand des Kopfes in Abhängigkeit zur Einstellung des Schultergürtels kann nach der Geburt des Kopfes

die vollständige Entwicklung des Kindes erschweren. Es kann zu Überdehnungen der Nerven und bei starkem Zug zu Abrissen oder Ausrissen der Nervenwurzeln des Plexus brachialis aus dem Rückenmark kommen. Vakuumextraktionen stellen hierbei einen hohen Risikofaktor für das Auftreten geburtstraumatischer Paresen des Plexus brachialis dar.<sup>82</sup> Durch die häufige Unterschätzung des tatsächlichen Geburtsgewichts werden präventive Maßnahmen zur Vermeidung einer Schulterdystokie zu selten in Anspruch genommen.

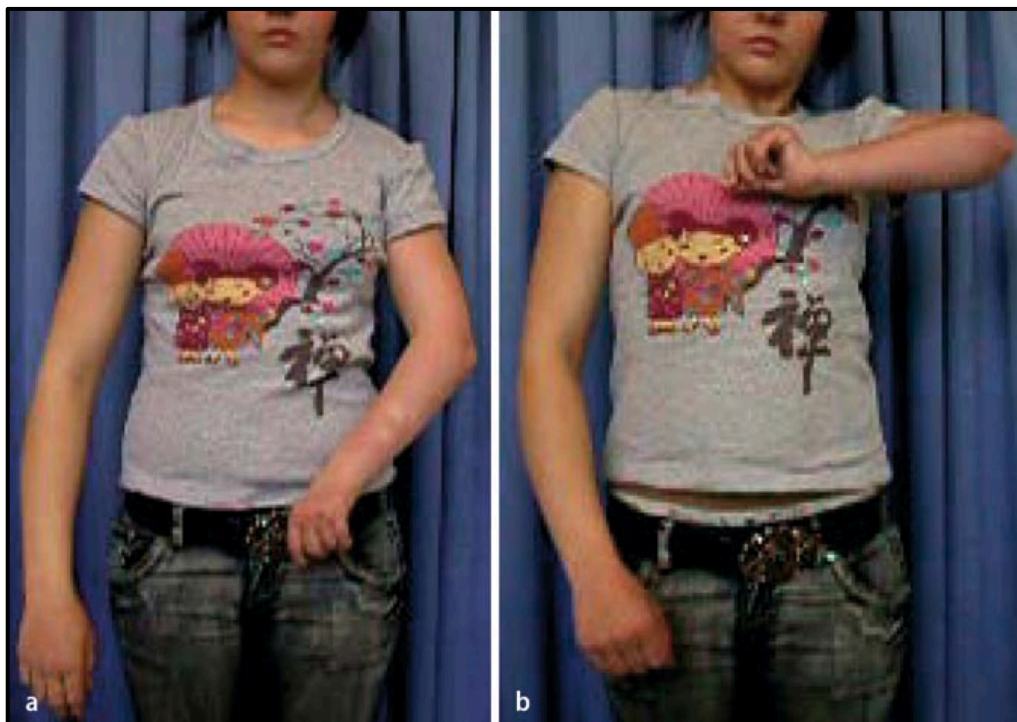


**Abb. 3** Schulterdystokie durch Größenmissverhältnisse zwischen Geburtskanal, Kopf und Schultergürtel des Kindes. Geburtstraumatische Verletzung des Plexus brachialis durch starken Zug am Kopf des Kindes möglich (Monatsschrift Kinderheilkunde 2010, 158: S. 264)

Die Verletzungen der peripheren Nerven bei einer geburtstraumatischen Plexusparese betreffen bei einer Erb-Lähmung die Nervenwurzeln C5, C6 und gegebenenfalls auch C7. Neben dieser oberen Lähmung des Plexus brachialis kann eine Verletzung der Wurzeln C5-Th1 eine komplette Plexusparese zur Folge haben. Befindet sich der Schaden ausschließlich im Bereich des unteren Plexus an den Wurzeln C8 und Th1 liegt eine Klumpke-Lähmung vor.

### 1.3.2 Sensomotorische Ausfälle und Genesung

Abhängig von der Lokalisation des Schadens am Plexus brachialis treten unterschiedliche sensomotorische Ausfälle auf. Die Erb-Lähmung führt mit Verletzungen der Nervenwurzeln C5 und C6 zu Ausfällen im Schulter- und Ellenbogenbereich während die Handfunktion erhalten bleibt. Im Gegensatz dazu kommt es bei der kompletten Plexusparese zum vollständigen Funktionsverlust der betroffenen Extremität. Die Klumpke-Lähmung, bei der ausschließlich die Wurzeln C8 und Th1 betroffen sind, zeigt das Bild einer gelähmten Hand, während Schulter- und Ellenbogenfunktion erhalten bleiben. Diese Form der Plexusparese stellt jedoch eine Ausnahme dar.<sup>2</sup> Bei der oberen Armplexusparese mit Verletzungen der Nervenwurzeln C5 und C6 kommt es aufgrund motorischer Ausfälle der von diesen Nerven versorgten Muskeln zu einer Innenrotation im Schultergelenk und einer Streckung im Ellenbogengelenk (Abb. 4). Des Weiteren kommt es zum Sensibilitätsverlust in den entsprechenden Dermatomen.



**Abb. 4** a) 15-jähriges Mädchen mit Erb-Lähmung links. Deutliche Verkürzung der linken oberen Extremität mit Innenrotationskontraktur und b) eingeschränkter Abduktion (Monatsschrift Kinderheilkunde 2010, 158: S. 265)

---

Bei Schädigungen der unteren Anteile des Plexus brachialis kann es durch den einseitigen Ausfall des Kopfteils des Sympathikus zu einem Horner-Syndrom mit der typischen Trias bestehend aus Miosis, Ptosis und Pseudoenophthalmus kommen. Ebenso können Klavikulafrakturen, Schulterluxationen und Phrenikusparesen auftreten. Für den Betroffenen bestehen langfristig abhängig vom Ausmaß der Verletzung unterschiedlich stark ausgeprägte Paresen oder Plegien sowie Verluste oder Einschränkungen der Sensibilität. Außerdem sorgen Wachstumsstörungen der betroffenen Extremität zu Verkürzung des Arms und Kontrakturen der Gelenke.

Da in vielen Fällen der geburtstraumatischen Parese des Plexus brachialis nur leichte Dehnungsverletzungen vorliegen, die Kontinuität der Nerven also noch erhalten bleibt, kommt es meistens zu vollständiger spontaner Rückbildung der Beschwerden.<sup>6</sup> Bereits wenige Tage nach der Geburt kann mit Hilfe einer Elektromyographie und Neurographie zwischen Dehnungsverletzungen und schweren Nervenschädigungen mit Beteiligung von Hüllstrukturen unterschieden werden. Je mehr Nervenwurzeln betroffen und ausgeprägter deren Verletzungen sind, desto unwahrscheinlicher ist eine vollständige Genesung.<sup>18</sup> Die spontane Rückbildung führt jedoch häufig zu ungeordneter Reinnervation mit Bildung von Kokontraktionen von Agonisten und Antagonisten eines Gelenks. Das Nachwachsen der durch die Waller-Degeneration verloren gegangenen Axone entlang der erhaltenen Hüllstrukturen ist die Voraussetzung für eine Wiedererlangung vollständiger Funktionalität. Ist es bei der Verletzung zu Schädigungen an den Hüllstrukturen der Nerven gekommen, fehlen diese als Gerüst für eine zielgerichtete Einsprossung der Axone. Wenn diese frei liegen, kommt es zum unorganisierten Nachwachsen ins umliegende Bindegewebe mit Bildung von Neuomen. Diese Form der Verletzung erfordert eine Exzision des geschädigten Segments mit anschließender Nervenrekonstruktion.<sup>116</sup> Bei Erhalt der Hüllstrukturen ist eine geordnete Wiedereinsprossung und somit die Reinnervation des Zielorgans gewährleistet. Bei einem Wachstum der Axone von etwa 1 mm pro Tag bei gleichzeitiger Atrophie und Degeneration der nicht innervierten Muskulatur ist die Beurteilung einer erfolgreichen Reinnervation erst Jahre später möglich. Die Geschwindigkeit der Genesung lässt jedoch Rückschlüsse auf eine Prognose zu. So ist eine vollständige Genesung weniger zu erwarten, wenn nach dem 3.

Lebensmonat noch keine Reinnervation des M. biceps brachii und des M. deltoideus feststellbar ist.<sup>50</sup> Dies kann mit Hilfe der Elektromyographie gut nachgewiesen werden. Zur Prognose einer möglichen Genesung eignet sich ebenfalls das motorische Summenaktionspotential. Ist dieses auf unter 10% zur Gegenseite reduziert ist mit einer deutlichen Schwäche nach 6 Monaten zu rechnen.<sup>59</sup>

## 1.4 Therapieansätze der geburtstraumatischen Plexusparese

### 1.4.1 Konservative Behandlung

Bei der konservativen Behandlung einer geburtstraumatischen Parese des Plexus brachialis steht die Physiotherapie im Vordergrund. Ohne diese tritt eine spontane Rückbildung der Symptome jedoch auch selbstständig bei etwa der Hälfte der Betroffenen nach 3 Monaten auf. Nach 18 Monaten ist der Großteil (82%) beschwerdefrei, jedoch erlangt der Rest der Patienten auch im weiteren Verlauf keine vollständige Funktion der betroffenen Extremität mehr.<sup>66</sup> Unter konservativer Therapie kann eine vollständige Erholung der Beschwerden bereits innerhalb weniger Wochen eintreten. Nach einigen Tagen Erholung nach der Geburt kann mit einer physiotherapeutischen Behandlung begonnen werden, bei der durch aktive und passive Bewegung die betroffenen Gelenke mobilisiert werden sollen. Bei schwerwiegenden Verletzungen jedoch kann diese Therapie eine Heilung nicht beschleunigen. Unterstützend soll aber auch in diesen Fällen eine konservative Therapie das Auftreten von sensomotorischen Einschränkungen so gering wie möglich halten. Eine auf die individuellen Eigenschaften des Kindes angepasste Physiotherapie hilft den betroffenen Arm möglichst früh in den gesamten motorischen Bewegungsablauf mit einzubinden. In der Frühbehandlung kann hierzu auch die Reflexlokomotion nach Vojta angewendet werden. Das Therapiekonzept nach Bobath soll dem Patienten helfen, Kontrolle über Muskelspannung und Bewegungsfunktion der betroffenen Extremität zu erlangen. Durch die fehlende Innervation der an der Innenrotation beteiligten Muskulatur bildet sich bei der oberen Plexusparese frühzeitig eine Tendenz zur Innenrotationskontraktur am Schultergelenk. Daher sollte frühzeitig eine passive Außenrotation der Schulter bei am Thorax angelegten Ellenbogen in den Verlauf der Behandlung einbezogen



werden. Auch eine Schienenbehandlung kann die Funktion insbesondere der Hand verbessern.<sup>106</sup> Um einer Verkürzung des Arms durch Wachstumsstörungen entgegen zu wirken, empfiehlt sich in den ersten Jahren die Belastungsfunktion an den Wachstumsfugen. Unter Sicherstellung der Gelenkstabilität kann somit frühzeitig Stützaktivität angeboten werden.

#### 1.4.2 Primäre operative Rekonstruktion des Plexus brachialis

##### 1.4.2.1 Anatomische Rekonstruktion

Die Wahl einer Operation wird durch das Ausmaß der Verletzung, die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Genesung und den Ergebnissen aus radiologischen und neurophysiologischen Untersuchungen bestimmt.<sup>19</sup> Aufgrund der schlechten Prognose bei nicht nachweisbarer Reinnervation des M. biceps brachii und des M. deltoideus nach dem 3. Lebensmonat, ist in diesem Fall eine operative Rekonstruktion indiziert.<sup>50</sup> Ein weiteres Kriterium stellt eine fehlende Ellenbogenbeugung im 6. Lebensmonat sowie die Unfähigkeit, die Hand im Alter von 9 Monaten zum Mund zu führen, dar.<sup>34</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die operative Rekonstruktion des Plexus brachialis vor dem 3. Lebensmonat die Notwendigkeit weiterer Operationen wie Muskeltransfers im späteren Verlauf vermindert.<sup>121</sup> Andere Studien hingegen konnten keine Unterschiede in der Genesung von Patienten die im 2. und denen die im 11. Monat operiert wurden feststellen.<sup>31</sup> Die Myelographie mit anschließender Computertomographie eignet sich zur Darstellung verletzter Nervenwurzeln.<sup>28</sup> Da bildgebende Verfahren bei Säuglingen in der Regel nur unter Narkosebedingungen möglich sind und die Interpretation der Verletzung häufig schwierig ist, kann letztlich erst die Operation Auskunft über das tatsächliche Ausmaß des Schadens geben. Unter Vollnarkose werden bei der anatomischen Rekonstruktion die betroffenen Nervenwurzeln über einen Zugang im lateralen Halsdreieck dargestellt und freigelegt. Durch Bildung von Neuomen können in schweren Fällen die einzelnen Trunci und Fasciculi nicht mehr voneinander abgegrenzt werden. Über neurophysiologische Elektrostimulation der Wurzeln kann intraoperativ deren motorische Antwort überprüft und der Schaden evaluiert werden. Die durch die Resektion des Neuoms hervorgerufene

Diskontinuität des Plexus kann durch Nerventransplantate des N. suralis behoben werden. Diese werden aus der Wade des Patienten entnommen, entsprechend der Ausdehnung des Schadens zu Faszikeln gebündelt und unter mikrochirurgischer Vergrößerung in die entstandene Lücke eingesetzt und koaptiert. Durch die Entfernung des Neuroms kommt es zum erneuten Nachwachsen der Axone für die jetzt das eingesetzte Nerventransplantat als Leitschiene für eine geordnete Einsprossung in die Peripherie dient. Aufgrund des Wachstums von etwa 1 mm pro Tag ist eine Beurteilung des Ergebnisses erst nach 2 Jahren möglich.<sup>51</sup>

#### 1.4.2.2 Extraanatomische Rekonstruktion

Stehen nach Ausrissverletzungen nicht mehr alle Wurzeln für eine anatomische Rekonstruktion zur Verfügung, können die noch vorhandenen Wurzeln durch eine extraanatomische Rekonstruktion mit Nervenfasern auf die wichtigsten peripheren Zielnerven gelenkt werden. Dieses Therapieverfahren wird als Neurotisation oder Nerventransfer bezeichnet und ermöglicht bei ausgeprägten Schäden mit mehreren Ausrissverletzungen die Umlenkung intakter, nicht dem Plexus brachialis angehörender Nervenfasern auf Muskeln der Schulter und des Arms. Die durch eine Neurotisation verloren gegangene Innervation der umgelenkten Nervenenden ist im Verhältnis zur gewonnenen Funktionalität für die obere Extremität zu vernachlässigen. Je nach Art des Traumas bieten sich verschiedene Neurotisationen an, die in der Regel im 6.-7. Lebensmonat durchgeführt werden. Für die Wiederherstellung der Abduktion und Außenrotation der Schulter wird der motorische Ast des N. accessorius auf den N. suprascapularis umgelenkt. Ähnlich gute Ergebnisse zur Rekonstruktion des N. suprascapularis wurden auch durch Zwischenschaltung von Nerventransplantaten aus den Stümpfen der oberen Wurzeln erzielt.<sup>96</sup> Die Rekonstruktion des N. axillaris erfolgt durch einen Transfer vom N. radialis auf diesen (Bertelli-Transfer). Dabei wird der motorische Ast des N. radialis verwendet, der zum Caput mediale des M. triceps zieht. Durch die verbleibende Funktion des Caput laterale und longum des M. triceps, bleibt die Fähigkeit zur Extension im Ellenbogengelenk weitestgehend erhalten. Bei Lähmung des N. musculocutaneus werden Teile des N. ulnaris auf diesen umgelenkt, wodurch die Beugung im Ellenbogengelenk wiederhergestellt wird (Oberlin-Transfer). Dabei

wird ein Faszikel des N. ulnaris verwendet, der hauptsächlich den M. flexor carpi ulnaris versorgt. Der dadurch hervorgerufene Ausfall dieses Muskels kann unter anderem durch die Funktion des M. flexor carpi radialis sowie der Mm. digitorum superficialis und profundus kompensiert werden. Ebenso steht der N. phrenicus als Spender nerv zur Verfügung. Da dieser häufig doppelt angelegt ist oder 2 Faszikel aufweist, kann ein Anteil ohne funktionelle Beeinträchtigung für eine Neurotisation verwendet werden, wobei ein Restanteil in Kontinuität erhalten bleibt. Selbst bei Ausriss aller Nervenwurzeln kann durch einen kontralateralen C7-Transfer nach Gu sowie durch die Hinzunahme von Interkostalnerven eine Wiederherstellung der Basisfunktionen gewährleistet werden.<sup>28</sup> Auch bei der extraanatomischen Rekonstruktion des Plexus brachialis können die Ergebnisse der Operation erst Jahre später beurteilt werden. In einer Langzeitstudie zeigten 80% der Kinder mit Läsionen der Wurzeln C5 und C6, sowie 61% mit Läsionen der Wurzeln C5, C6 und C7 gute bis exzellente Ergebnisse nach 4 Jahren. Auch bei kompletten Plexusparesen konnten bei 77% nach 8 Jahren mittelmäßige, gute bis exzellente Ergebnisse in der Schulterfunktion festgestellt werden. Für die Ellenbogenfunktion konnten bei Läsionen der oberen Anteile des Plexus brachialis immer gute Ergebnisse erzielt werden und auch für die kompletten Plexusparesen zeigten 81% gute oder exzellente Ergebnisse nach 8 Jahren. Eine nutzbare Funktion der Hand konnten 76% der Kinder mit kompletter Plexusparese ebenfalls nach 8 Jahren aufweisen.<sup>49</sup>

#### 1.4.2.3 Problematik des Zeitpunkts einer primären Operation

Die Entscheidung zur primären Operation durch anatomische oder extraanatomische Rekonstruktionen des Plexus brachialis erfordert eine sorgfältige Evaluation der durch die Plexusparese entstandenen Bewegungsdefizite. Zur regelmäßigen Überprüfung der Funktion der oberen Extremität sollten in den ersten 3 Monaten klinische Untersuchungen in einem Abstand von 3 Wochen erfolgen. Bei persistierender Funktionseinschränkung kann im Alter von 6-9 Monaten die primäre Operation durchgeführt werden. Dieses enge Zeitfenster sollte nicht verpasst werden. Im Fall von schweren und kompletten Paresen ohne jegliche Zeichen einer Reinnervation kann dieser Zeitpunkt jedoch bereits zu spät sein. Daher ist es von

großer Bedeutung die Prognose einer möglichen Reinnervation im Verlauf durch elektrophysiologische Untersuchungen regelmäßig zu evaluieren. So kann bei Patienten mit ungünstiger Prognose für eine spontane Reinnervation die operative Rekonstruktion bereits früher indiziert sein. Wird der Zeitpunkt für eine primäre Operation verpasst, sind oft nur noch sekundäre motorische Ersatzoperationen zur Verbesserung des Bewegungsumfangs möglich. Häufig wird zu lange auf eine selbstständige Verbesserung der Armfunktion gewartet, wenn eigentlich eine primäre Operation sinnvoll gewesen wäre. Aufgrund des fortgeschrittenen Alters und der bereits irreversibel vorliegenden Schädigung der Muskulatur ist diese dann häufig nicht mehr möglich. Ein weiterer Grund für den verpassten Zeitpunkt einer primären Operation ist eine mangelnde Aufklärung der Eltern betroffener Kinder, die nur bedingt über die Folgen sowie über Behandlungsmöglichkeiten der Plexusparese informiert sind. So herrscht in vielen Fällen Unkenntnis über das Krankheitsbild, dass als eine Art der Armlähmung eingeschätzt wird, für die ohnehin keine operativen Therapiemöglichkeiten existieren.

#### 1.4.3 Sekundäre motorische Ersatzoperationen durch Muskeltransfer

Der Einsatz motorischer Ersatzoperationen durch Muskeltransfer dient dem Wiederherstellen von Funktionen, die aufgrund fehlender Innervation der eigentlich zuständigen Muskeln nicht mehr ausgeführt werden können. Grundlage hierfür ist die Umlagerung intakter Muskeln mit ihrem sehnigen Ansatz auf gelähmte Muskeln, wodurch eine Funktionsübertragung hergestellt werden soll. Diese Technik ermöglicht eine weitere funktionelle Verbesserung nach primären operativen Rekonstruktionen des Plexus brachialis. So ist die motorische Ersatzoperation durch Muskeltransfer ab einem Alter von 2 Jahren indiziert, wenn die Reinnervation abgeschlossen ist und stets Funktionseinschränkungen bestehen. Aber auch ohne primäre Operation kann ein Muskeltransfer selbst im Jugendalter eingesetzt werden um Innenrotationskontrakturen zu beheben oder frühzeitiger Omarthrose vorzubeugen. Es stehen verschiedene operative Methoden zur Verfügung, die jeweils eine bestimmte Funktion eines Gelenks verbessern sollen. Dabei wird jedoch selten eine normale Kraft wiedererlangt. Voraussetzungen für einen erfolgreichen Muskeltransfer ist zum einen eine freie, passive Gelenkbeweglichkeit und ein

narbenfreies Gleitlager und zum anderen die adäquate Kraft des verwendeten Muskels sowie eine geeignete Muskelamplitude.<sup>21</sup>

Ursache einer mangelnden Außenrotation ist die fehlende Innervation des M. teres minor und M. infraspinatus. Klinische Befunde können mit Hilfe einer Elektromyographie bestätigt werden, womit die Denervation dieser beiden Muskeln sowie die synchrone Innervation des M. latissimus dorsi und M. teres major festgestellt werden kann.<sup>55</sup> Durch die sichergestellte Funktion der beiden Muskeln können diese nach Umlagerung die Aufgabe der denervierten Muskeln übernehmen. Bei stark ausgeprägter Innenrotationskontraktur muss für einen erfolgreichen Muskeltransfer zunächst die Voraussetzung einer freien, passiven Gelenkbeweglichkeit gewährleistet werden. Dies erreicht man durch eine operative Verlängerung der Sehne des M. subscapularis.<sup>14</sup> Gleichzeitig oder zu einem späteren Zeitpunkt kann zur Verbesserung der Außenrotation und Abduktion die Sehne des M. latissimus dorsi an den Ansatz des M. infraspinatus fixiert werden.<sup>93</sup> Die dadurch aufgehobene Funktion dieses Muskels als kräftiger Innenrotator mit gleichzeitiger Funktionsübernahme eines Außenrotators im Schultergelenk kann der typischen Folgeerscheinung einer geburtstraumatischen Parese des Plexus brachialis entgegenwirken. Als weitere Verstärkung der Außenrotation kann zusätzlich die Sehne des M. teres major an den Ansatz des M. infraspinatus umgelagert werden. Die Umlagerung zwei kräftiger Innenrotatoren an die Position eines Außenrotators bei gleichzeitiger Verlängerung der Sehne des M. subscapularis kann jedoch zu einer Disbalance zwischen Außenrotation und Innenrotation führen, so dass der alleinige Transfer des M. latissimus dorsi bevorzugt wird.<sup>93</sup> Bei einem Ausfall des M. deltoideus und M. supraspinatus kann zur Verbesserung der Abduktion der M. trapezius nach Ablösung von Klavikula und Akromion an den Ansatz des M. deltoideus fixiert werden.<sup>103</sup>

Durch die fehlende Innervation des M. biceps brachii kommt es zum Verlust der Flexion im Ellenbogengelenk. Zur Rekonstruktion dieser Funktion stehen verschiedene operative Verfahren zur Verfügung. Durch eine Umlagerung der distalen Anteile des M. pectoralis major an den Ansatz des M. biceps brachii kann die Flexion im Ellenbogengelenk verbessert werden.<sup>33</sup> Ebenso kann der gesamte

oder gespaltene Ansatz des M. latissimus dorsi auf die distale Sehne des M. biceps brachii transpositioniert werden.<sup>136</sup> Dieses Verfahren macht jedoch nur Sinn, wenn der Verlust der Ellenbogenbeugung im Vergleich zu einer bestehenden Innenrotationskontraktur von größerer Bedeutung ist, denn ein Transfer des M. latissimus dorsi kann ebenfalls zur Rekonstruktion der Außenrotation angewendet werden. Eine weitere Option stellt die Verlagerung der Sehne des M. triceps brachii an den Ansatz des M. biceps brachii dar.<sup>24</sup> Dieses Verfahren ist zuverlässig und die Ergebnisse sind gut, vorausgesetzt die Patienten haben eine stabile Schulter und weisen eine nahezu normale Kraft in der Hand sowie bei der Ellenbogenextension auf.<sup>1</sup> Die in Folge dieser Operation ausgefallene Extension im Ellenbogengelenk kann häufig durch die Schwerkraft ausgeglichen werden jedoch führt ein Verlust der aktiven Ellenbogenstreckung in vielen Fällen zu einer Beugekontraktur. Durch einen Muskeltransfer des M. latissimus dorsi oder der dorsalen Anteile des M. deltoideus kann dieses Problem jedoch behoben werden. Zur Verbesserung der Flexion im Ellenbogengelenk kann unter Verwendung des N. accessorius als Spendernerv auch ein freier Muskeltransfer des M. gracilis erfolgen.<sup>8</sup>

Bei Ausfällen von Funktionen im Handgelenk und der Hand aufgrund der Parese des unteren Plexus brachialis kann eine individuell auf die vorliegende Einschränkung ausgerichtete operative Therapie angewendet werden. In vielen Fällen liegt eine Ulnardeviation vor, die durch Verlagerung der Sehne des M. extensor carpi ulnaris auf die Sehne des M. extensor carpi radialis longus ausgeglichen werden kann.<sup>51</sup> Besteht ebenfalls eine Supinationskontraktur im Handgelenk kann diese zeitgleich durch umsetzen der Sehne des M. biceps brachii um den proximalen Radius aufgelöst werden.<sup>135</sup> Bei mangelnder Streckfunktion des Handgelenks und der Finger bei gleichzeitig starken Beugemuskeln im Unterarm kann die Sehne des M. flexor carpi ulnaris auf die Extensoren des Handgelenks oder der Finger transpositioniert werden.<sup>51</sup> Stehen nicht ausreichend Spendermuskeln des Unterarms zur Verfügung besteht die Möglichkeit die Extension oder Pronation im Handgelenk durch einen Transfer des M. brachialis an den M. pronator teres, den M. extensor carpi radialis brevis oder den M. extensor carpi radialis longus zu verbessern.<sup>13</sup> Durch einen Transfer des M. supinator an den M. extensor pollicis brevis kann eine fehlende Extension des Daumens wiederhergestellt werden.<sup>15</sup>

---

#### 1.4.4 Mögliche Ansätze molekularer Therapie

Im Anschluss an eine Verletzung peripherer Nerven spielen sich auf molekularer Ebene biochemische Prozesse ab, die für das Überleben, die Degeneration und die Regeneration der Nervenzellen sorgen. Eine große Bedeutung bei diesen Prozessen haben neurotrophe Faktoren aus der Gruppe der Zytokine. Bereits während der Entwicklung ist das Wachstum peripherer Neurone entscheidend von geringen Mengen neurotropher Faktoren abhängig.<sup>20</sup> In gesundem Nervengewebe findet eine permanente Exprimierung auf niedrigem Niveau statt. Bei Verletzungen peripherer Nerven jedoch werden diese Faktoren entweder durch autokrine oder parakrine Quellen in hohen Konzentrationen zur Verfügung gestellt und fördern das Überleben und das Wachstum der Neurone.<sup>120</sup> Zu den neurotrophen Faktoren gehören der Nerve Growth Factor (NGF), der Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) sowie Neurotrophin-3, -4 und -5 (NT-3 bis -5). Mit niedriger Affinität binden sie an den Neurotrophin-Rezeptor p75 (p75NTR), was zu einem programmierten Zelltod führt. Eine hohe Affinität haben diese Faktoren zu spezifischen Tyrosinkinase Rezeptoren (Trk-R), wodurch eine Kaskade von Kinasen mit anti-apoptotischen Auswirkungen ausgelöst wird.<sup>134</sup> Dabei bindet NGF an Trk A, BDNF sowie NT-4/-5 an Trk B und NT-3 an Trk C.<sup>29</sup>

Nach Verletzungen peripherer Nerven ist innerhalb von Stunden ein starker Anstieg von NGF-mRNA in neuronalen Zellkernen nachweisbar. BDNF zeigt einen Anstieg der Konzentration erst nach drei bis sieben Tagen und erreicht ab etwa vier Wochen sein Maximum. Hierbei scheint die Konzentration abhängig vom jeweiligen neuronalen Schaden zu sein. So wurden bei einer Neurotmesis, also der vollständigen Durchtrennung des Nerven, höhere Werte als bei einer Neurapraxie, bei der Hüllstrukturen erhalten bleiben, gemessen.<sup>20</sup> Die Konzentration von NT-3 ist in gesundem Nervengewebe bereits hoch, fällt jedoch nach einer Verletzung innerhalb eines Tages ab um erst nach etwa zwei Wochen wieder physiologische Werte zu erreichen.<sup>80</sup>

Aufgrund des Anstiegs einiger Neurotrophine in Nervenenden nach beginnender Denervation und Rückkehr auf normale Werte bei einsetzender Reinnervation,

dienen deren Konzentrationen als Marker für den Status der Regeneration motorischer oder sensibler Nerven.<sup>80</sup> Durch die Vermittlung der Polymerisation und Akkumulation von F-Aktin durch Neurotrophine wird das axonale Wachstum während der Entwicklung und nach Verletzungen stimuliert. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass sie neuronale Schäden durch Verringerung der Auswirkungen von Excitotoxinen, Glucosemangel und Ischämie reduzieren. Untersuchungen ergaben, dass die exogene Verabreichung neurotropher Faktoren schützende Wirkung auf verletzte Neurone hat sowie deren Regeneration anregt. Basierend auf diesen Eigenschaften können Neurotrophine als molekulare Therapeutika zur lokalen Behandlung von traumatischen Verletzungen des peripheren Nervensystems eingesetzt werden.<sup>75</sup> Neben traumatischen Nervenläsionen wurde NGF ebenso in der Therapie von Krankheiten des zentralen Nervensystems wie Parkinson und Alzheimer eingesetzt.<sup>89</sup>

Seit der Entdeckung eines Zusammenhangs zwischen Angiogenese und Neurogenese wird der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) im Einsatz zur verbesserten Nervenregeneration untersucht.<sup>111</sup> Neuere Erkenntnisse zeigen einen direkten Effekt auf neuronale Zellen. Bei reduzierten VEGF-Konzentrationen kann die Degeneration von Motoneuronen durch begrenzte Gewebepерfusion und VEGF abhängige Neuroprotektion gefördert werden.<sup>114</sup> In Versuchen konnte eine Stimulation der Aussprossung von Axonen sowie ein verbessertes Überleben von Neuronen beobachtet werden.<sup>112</sup> Der neuroprotektive Effekt von VEGF wird auch durch eine verringerte Empfindlichkeit der Motoneurone gegen Ischämien vermittelt. Darüber hinaus gilt VEGF als Modifikator der Degeneration von Motoneuronen bei der Amyotrophen Lateralsklerose.<sup>69</sup> Hintergrund der Effekte ist die Bindung von VEGF an Neuropilin-Rezeptoren (NRP-1 und NRP-2), die sich nach einem Nervenschaden auf den Wachstumskolben der Axone befinden und dadurch deren Aussprossung fördern sowie die VEGF induzierte Angiogenese.<sup>111</sup>



---

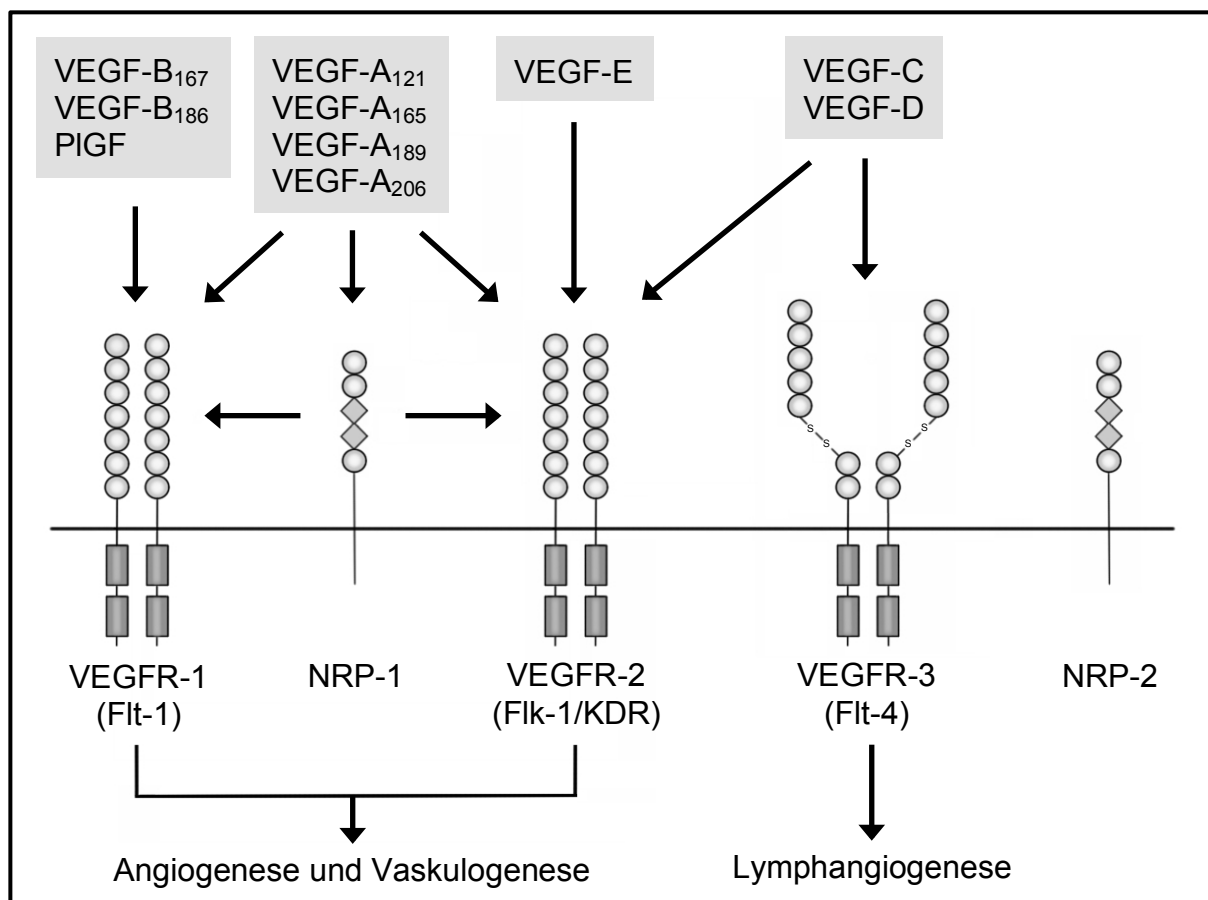
## 1.5 Einsatz von VEGF zur verbesserten Nervenregeneration

### 1.5.1 VEGF und Angiogenese

Zur Gruppe des Vascular Endothelial Growth Factors gehören sechs verschiedene Formen bestehend aus VEGF A-E sowie dem Placental Growth Factor (PlGF). Eine bedeutende Funktion hat VEGF-A als Signalmolekül im Prozess der Angiogenese sowie in der Vaskulogenese zur Bildung des embryonalen Blutkreislaufes.<sup>133</sup> Neben angiogenetischen Fähigkeiten entfaltet VEGF-A seine Wirkung ebenfalls durch Steigerung der Permeabilität und Vasodilatation.<sup>41</sup> Dies geschieht, indem VEGF die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) in der Gefäßwand fördert, was zur Vasodilatation führt und ein Absinken des Blutdrucks zur Folge hat.<sup>60</sup> Durch mitogene Eigenschaften wird vaskuläres Endothel stimuliert während gleichzeitig Monozyten und Makrophagen angelockt werden.<sup>133</sup> Diese sorgen durch Freisetzung weiterer angiogenetischer Faktoren, Zytokinen und Proteasen für eine zusätzliche Stimulation des Wachstums.<sup>4</sup> Die Freisetzung von VEGF geschieht in der Intima der Blutgefäße und sorgt in der Frühphase der Angiogenese für eine Steigerung der Permeabilität der Blutgefäße, was zur Einwanderung von Plasmaproteinen führt, die ein provisorisches Gerüst für die Endothelzellen bilden.<sup>27</sup> Neben Zellen des vaskulären Gewebes wird VEGF ebenfalls von anderen Zellen unterschiedlichen Ursprungs exprimiert. VEGF-A ist ein homodimeres Glykoprotein, das aus zwei Untereinheiten von jeweils 23 kDa zusammengesetzt ist.<sup>43</sup> Das für VEGF-A kodierende Gen befindet sich auf Chromosom 6 und besteht aus acht Exons, die durch sieben Introns getrennt werden.<sup>123</sup> Durch alternatives Splicing entstehen unter anderem die vier verschiedenen Isoformen VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>189</sub> und VEGF-A<sub>206</sub>. Die Nummern stehen für die Anzahl der Aminosäuren im jeweiligen Protein. Während die basischen Isoformen VEGF-A<sub>189</sub> und VEGF-A<sub>206</sub> an heparinhaltige Oberflächen der extrazellulären Matrix binden können, fehlt der sauren Isoform VEGF-A<sub>121</sub> diese Eigenschaft.<sup>92</sup> Grund hierfür ist das Fehlen des Exons 7, das basische Eigenschaften besitzt und für die Bindung an extrazelluläre Matrix sowie an spezifische Rezeptoren entscheidend zu sein scheint.<sup>110</sup> Die häufigste Isoform VEGF-A<sub>165</sub> bindet ebenfalls an extrazelluläre Matrix, kommt aber auch in löslicher Form vor. Die Genexpression von VEGF unterliegt

unterschiedlichen physiologischen, als auch pathologischen Mechanismen. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei die Hypoxie im Gewebe. Bei niedrigem Sauerstoff-Partialdruck mit anschließender Hypoxie wird die Expression der mRNA von VEGF induziert.<sup>37</sup> Des Weiteren kann die Sekretion von Wachstumsfaktoren, Entzündungsmediatoren sowie die Mutation von Onkogenen Auslöser der Expression sein.

Alle Formen der Gruppe des Vascular Endothelial Growth Factors binden an verschiedene Tyrosinkinase-Rezeptoren und bewirken dadurch eine zelluläre Antwort. Die wichtigsten Rezeptoren stellen dabei VEGFR-1/Flt-1 und VEGFR-2/Flk-1/KDR dar.<sup>41</sup> Im Rahmen einer zellulären Hypoxie findet eine Hochregulation der Expression von VEGFR-1 statt, wofür von der Zelle produzierter Hypoxia inducible Factor (HIF) verantwortlich ist.<sup>48</sup> Ebenfalls fördern diese Faktoren die Expression der mRNA von VEGF, womit neben dem Rezeptor gleichzeitig das entsprechende Bindungsmolekül zur Verfügung steht. VEGFR-2 hingegen hat eine entscheidende Funktion im Prozess der Vaskulogenese. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des Rezeptors bei Mäusen einen Tod in der frühen embryonalen Phase ohne Bildung organisierter Blutgefäße und Blutinseln zur Folge hat. Gleichzeitig waren hämatopoetische Vorläuferzellen stark reduziert.<sup>104</sup> Des Weiteren bindet VEGF an VEGFR-3/Flt-4, was im Prozess der Lymphangiogenese von Bedeutung ist.<sup>118</sup> Es besteht ebenfalls eine Affinität von VEGF zu Neuropilin-Rezeptoren (NRP-1 und NRP-2), wodurch eine neurotrophe Wirkung hervorgerufen wird. NRP-1 präsentiert dabei gebundenes VEGF<sub>165</sub> an VEGFR-2 und verstärkt deren Bindung.<sup>111</sup> Wird VEGF gebunden kommt es zu einer Dimerisierung und Autophosphorylierung der spezifischen Rezeptoren, womit die Signale weitergeleitet werden.<sup>42</sup> Es herrschen unterschiedliche Affinitäten der verschiedenen Formen des VEGF zu den genannten Rezeptoren.



**Abb. 5** Rezeptorinteraktionen von VEGF (modifiziert nach Hicklin 2005)

Das für VEGF-B kodierende Gen befindet sich auf Chromosom 11. Durch alternatives Splicing entstehen die zwei Isoformen VEGF-B<sub>167</sub> und VEGF-B<sub>186</sub>. Während das Fehlen von VEGF-A zu einem Tod im Verlauf der Embryogenese bei Mäusen führt, ist bei einem Verlust des für VEGF-B kodierenden Gens zunächst eine gesunde Entwicklung zu beobachten. Die Tatsache, dass in diesen Fällen jedoch eine reduzierte Herzgröße sowie eine beeinträchtigte Erholung nach kardialen Ischämien vorliegt, weist auf eine Bedeutung von VEGF-B im Rahmen koronarer Vaskularisation und Entwicklung des Herzens hin.<sup>11</sup> Das für VEGF-C kodierende Gen befindet sich auf Chromosom 4. Der Zusammenhang zwischen der gleichzeitigen Expression von VEGF-C und VEGFR-3 während der Entwicklung lymphatischen Epithels im Verlauf der Embryogenese lässt auf eine parakrine Wirkungsweise und eine wichtige Funktion von VEGF-C in der Regulation der Angiogenese des lymphatischen Gefäßsystems schließen.<sup>65</sup> VEGF-D, das sich auf dem X-Chromosom befindet, hat durch die Bindung der gleichen Rezeptoren wie

VEGF-C ebenfalls Einfluss auf die Entwicklung der Lymphgefäße in der embryonalen Phase.<sup>87</sup> Das Gen für VEGF-E wird durch den Parapoxvirus ovis (Orf-Virus) kodiert und stellt einen verwandten viralen Homologen von VEGF-A dar. VEGF-E besitzt eine ähnliche Bioaktivität wie VEGF-A und hat durch die selektive Bindung an VEGFR-2 Einfluss auf die Angiogenese.<sup>79</sup>

Angiogenese beschreibt den Prozess der Bildung von Kapillaren durch Sprossung aus einem bereits bestehenden Gefäßsystem.<sup>27</sup> Die Neubildung von Gefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen wird als Vaskulogenese bezeichnet.<sup>26</sup> Im Verlauf der Arteriogenese erfolgt die Stabilisation unreifer Gefäße durch murale Zellen.<sup>27</sup> Die Aktivierung der zur Bildung der Gefäßwände notwendigen Endothelzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen erfolgt durch verschiedene angiogenetische Wachstumsfaktoren. Zu diesen gehört die Gruppe des Fibroblast Growth Factors (FGF), von dem bisher mehr als zwanzig verschiedene Formen bekannt sind.<sup>132</sup> FGF stimuliert die Proliferation von Zellen mesodermaler und neuroektodermaler Herkunft, einschließlich Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Myoblasten.<sup>47</sup> Die Proliferation vaskulärer Zellen wird ebenso durch den Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) stimuliert, der auch deren Interaktion mit der extrazellulären Matrix reguliert.<sup>86</sup> Exprimiert wird TGF- $\beta$  in wachsenden Kollateralarterien und spielt im Prozess der Differenzierung und Umwandlung von Gefäßen eine wichtige Rolle.<sup>105</sup> Der Platelet-derived Growth Factor (PDGF) sorgt durch die Rekrutierung von Perizyten um wachsende Gefäße für eine Stabilisierung der Kapillarstruktur und hat somit eine entscheidende Funktion im Rahmen der Arteriogenese.<sup>71</sup> Ebenfalls gefäßstabilisierende Wirkung hat das Angiopoetin-1 (Ang-1).<sup>131</sup> Über die Aktivierung des Tie-2-Rezeptors fördert Ang-1 den engeren Kontakt der Endothelzellen.<sup>36</sup> Angiopoetin-2 (Ang-2) ist in der Lage den Tie-2-Rezeptor zu aktivieren und zu blockieren.<sup>131</sup> Somit ist durch Ang-2 neben aktivierender Wirkung ebenfalls eine Destabilisierung des Endothels möglich. Des Weiteren ist Ang-2 in der Lage die Sensitivität für VEGF im Gewebe zu erhöhen.<sup>91</sup>

---

### 1.5.2 Protektiver Effekt von VEGF auf $\alpha$ -Motoneurone im Rückenmark

Die Interaktion zwischen reifenden Motoneuronen und ihren Zielstrukturen ist während der frühen postpartalen Periode unerlässlich für das Überleben der Motoneurone.<sup>73</sup> Eine Unterbrechung der Interaktion durch Nervenverletzungen in dieser kritischen Phase führt zum Absterben der entsprechenden  $\alpha$ -Motoneurone im Rückenmark.<sup>107</sup> Daraus resultieren Anpassungsmechanismen im Rückenmark und auf supraspinaler Ebene um den Verlust der Motoneurone zu kompensieren. So zeigten Untersuchungen, dass nach einer geburtstraumatischen Läsion des Plexus brachialis die Wurzel C7 zur Innervation des M. biceps brachii und M. deltoideus beiträgt.<sup>128</sup> Dies steht im Gegensatz zur normalen Innervation beim Erwachsenen, bei dem die Wurzeln C5 und C6 für diese Aufgabe verantwortlich sind. Demnach lässt sich vermuten, dass nach einer geburtstraumatischen Verletzung der Nervenwurzeln C5 und C6 die benachbarten Motoneurone des Segments C7 die Funktion der abgestorbenen Motoneurone übernehmen. Dies konnte durch Versuche an Ratten bestätigt werden, bei denen Quetschtraumata der Wurzeln C5 und C6 in der frühen postpartalen Periode zu einer Übernahme der Funktion der Wurzel C7 führte.<sup>63</sup>

Die Degeneration von Motoneuronen bei der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) wird durch VEGF beeinflusst.<sup>69</sup> Diese unheilbare neurodegenerative Erkrankung ist charakterisiert durch einen Verlust von Motoneuronen im Rückenmark, Hirnstamm und Motorcortex. Sie betrifft Menschen zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr, selten erkranken jüngere Menschen zwischen 20 und 30 Jahren. ALS verursacht progressive Muskelschwäche und führt nach etwa 3 bis 5 Jahren durch Lähmung der Atemmuskulatur zum Tod.<sup>102</sup> Bei 1-2% der Patienten liegt eine Mutation im Gen der Superoxiddismutase (SOD-1) vor, was oxidativen Stress als möglichen Faktor der Pathogenese vermuten lässt.<sup>99</sup> Daneben scheinen Excitotoxizität, Proteinaggregationen sowie Entzündungen eine Rolle zu spielen.<sup>35</sup> Niedrige Konzentrationen von VEGF im Rückenmark erhöhen das Risiko an ALS zu erkranken.<sup>69</sup> Der Zusammenhang zwischen VEGF und ALS wurde anhand einer genetisch veränderten Maus (VEGF $\delta/\delta$ -Maus) dargestellt, in der das hypoxia-responsive element (HRE) in der Promotor Region des VEGF-Gens gelöscht wurde,

was zu progressiver Degeneration von Motoneuronen, vergleichbar der ALS führte.<sup>90</sup> Bei zellulärer Hypoxie bindet Hypoxia inducible Factor (HIF) an das HRE, wodurch die Transkription des VEGF-Gens durch die RNA-Polymerase vermittelt wird. Durch das Fehlen des HRE bei der VEGF $\delta/\delta$ -Maus und die damit reduzierte hypoxische Expression von VEGF im Rückenmark wurde die entsprechende Degeneration der Motoneurone verursacht. Verantwortlich dafür scheint die reduzierte neuronale vaskuläre Perfusion zu sein.<sup>90</sup> Später durchgeführte Untersuchungen konnten die ungewöhnliche Anfälligkeit anhaltender Lähmungen nach Ischämien im Rückenmark der VEGF $\delta/\delta$ -Maus bestätigen. Durch die Behandlung entsprechender Mäuse mit VEGF konnten die Motoneurone gegen ischämisches Absterben geschützt werden.<sup>69</sup> Der direkte Effekt von VEGF<sub>165</sub> auf das Überleben von Motoneuronen in vitro konnte an embryonalen Zellen von Ratten und Mäusen dargestellt werden. Die Induktion einer Hypoxie und Hypoglykämie zeigte einen protektiven Effekt von VEGF durch eine signifikant höhere Anzahl überlebender Motoneurone in der Versuchsgruppe im Vergleich zu nicht mit VEGF behandelten Zellen.<sup>125</sup>

Im Gegensatz zur ALS, bei der die Lähmungen direkt durch eine Degeneration der Motoneurone im Rückenmark verursacht wird, handelt es sich bei der geburtstraumatischen Parese des Plexus brachialis um einen Schaden peripherer Nerven mit konsekutivem Absterben der entsprechenden Motoneurone. Der in dieser Arbeit untersuchte Effekt von VEGF auf das Überleben und die Regeneration von Motoneuronen im Rückenmark nach einer geburtstraumatischen Plexusparesse basiert primär auf der Tatsache, dass durch eine verbesserte Regeneration der geschädigten peripheren Nerven das Absterben der Motoneurone reduziert werden kann. Die durch die neurotrophen und angiogenetischen Eigenschaften von VEGF aufrechterhaltene Interaktion zwischen reifenden Motoneuronen und ihren Zielstrukturen könnte den zwangsläufigen Untergang der Motoneurone verhindern.

---

## 1.6 Gentherapie mit VEGF

### 1.6.1 Applikationsmethoden für VEGF

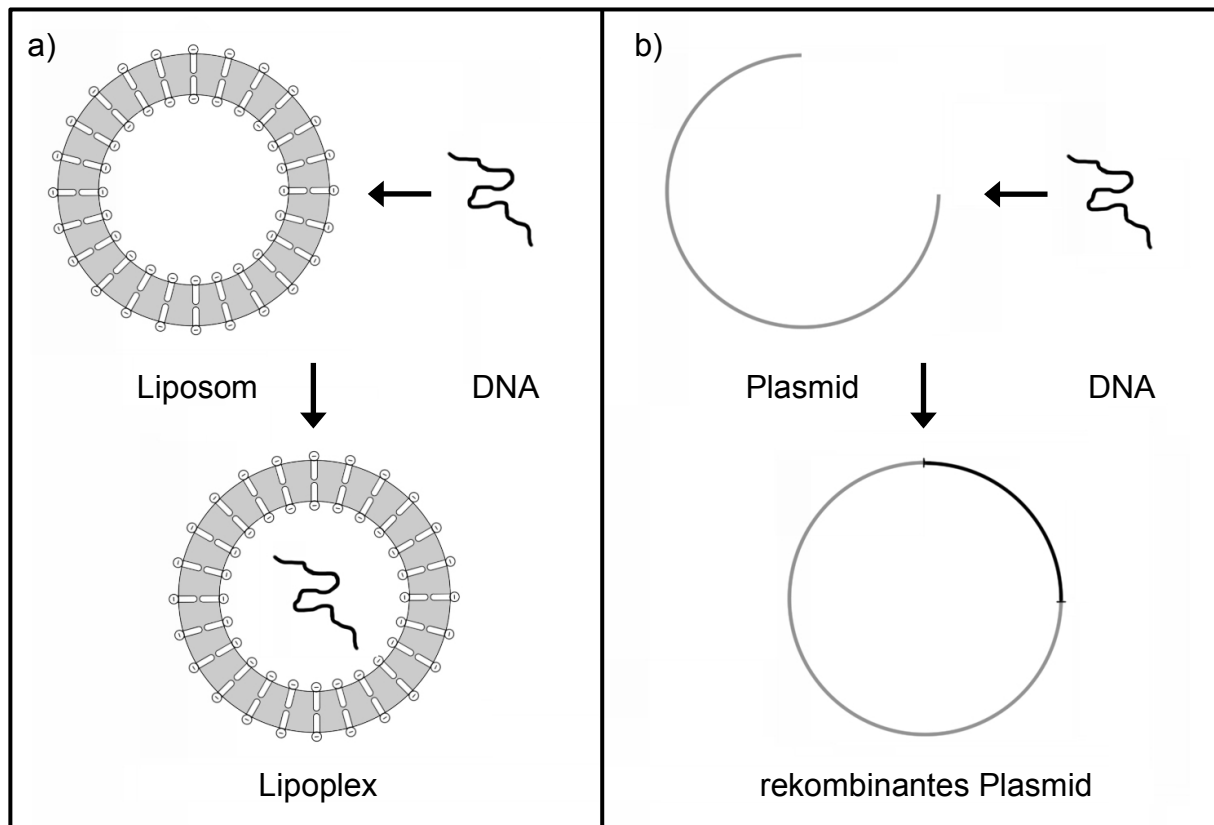
Das Ziel einer Therapie mit VEGF besteht in der Aufrechterhaltung einer hohen Konzentration im zu behandelnden Gewebe. Die direkte Applikation eines Wachstumsfaktors als Protein würde den gewünschten Effekt nicht zuverlässig erzielen.<sup>57</sup> Hierfür ist die schnelle Abnahme der Konzentration am Zielort durch die kurze Halbwertszeit der Proteine verantwortlich.<sup>67</sup> Anders beim Einsatz gentechnischer Verfahren, wodurch eine hohe Gewebekonzentration für einen bestimmten Zeitraum erreicht werden kann. Hierbei wird die gezielte Modifikation von genetischem Material und dessen Einbringung in Zellen ermöglicht. Diese sollen dann in der Lage sein, die eingeführte Erbinformation zu replizieren und über die Translation das entsprechende Protein in hoher Konzentration zu synthetisieren. In diesem Fall wäre es der Wachstumsfaktor VEGF, der nach erfolgreicher Gentherapie von den behandelten Zellen ins umliegende Gewebe exprimiert wird. Um eine alleinige Übertragung der für die Translation relevanten Abschnitte der DNA zu ermöglichen, wird die für VEGF kodierende cDNA verwendet. Diese wird durch die reverse Transkriptase hergestellt, die aus mRNA die dazu komplementäre DNA anfertigt. Die cDNA enthält nur noch die kodierenden Exons und keine Introns mehr. Da die Applikation nackter DNA zu einer unzureichenden Aufnahme in die Zelle führen würde, muss sie mit einem Vektor verknüpft werden. Diese können nicht-viraler und viraler Herkunft sein. Die Übertragung genetischen Materials über nicht-virale Vektoren wird als Transfektion, die Übertragung über virale Vektoren als Transduktion bezeichnet.

Der nicht-virale Gentransfer basiert am häufigsten auf der Verwendung von Plasmiden oder Liposomen als Vektor. Plasmide sind ringförmige doppelsträngige DNA-Moleküle, die extrachromosomal in Bakterien vorkommen können und zumeist Gene für die Konjugation und auch für Resistenzen gegen Antibiotika tragen. Durch gentechnische Verfahren kann die gewünschte DNA sowie ein vorangestellter Promotor zum Erreichen einer hohen Genexpression in das Plasmid integriert werden. Dieses liegt dann als rekombinantes Plasmid vor. Nach Applikation

rekombinanter Plasmide gelangt ein Teil dieser in den Zellkern der behandelten Zellen, was zur Transkription der klonierten DNA-Sequenz und somit zur Synthese des Proteins führt. Nachteil dieses Verfahrens ist die zu geringe Aufnahme der Plasmide vom Zellkern. Die aufgenommene DNA wird dabei auch nicht stabil in die chromosomale DNA integriert, wodurch die Expression nur vorübergehend erfolgt. Die Applikation rekombinanter Plasmide mit dem klonierten Gen für VEGF würde nur zu bescheidenen Erhöhungen des gewünschten Genprodukts für einen ebenfalls zu kurzen Zeitraum von weniger als 2 Wochen führen.<sup>45</sup> Somit ist der Einsatz von Plasmiden trotz Vorteilen wie der Produktion und der einfachen Verwendung aufgrund unzureichender und zu stark limitierter Genexpression des VEGF für die Untersuchungen dieser Arbeit nicht geeignet.

Neben Plasmiden stellt der Einsatz von Liposomen eine weitere häufig angewandte Möglichkeit für einen nicht-viralen Gentransfer dar.<sup>23</sup> Liposomen bestehen aus einer kugelförmigen Anordnung einer oder mehrerer Lipid-Doppelschichten, deren hydrophile Enden nach außen und die hydrophoben Enden nach innen gerichtet sind. Im Inneren dieser Vesikel kann die gewünschte DNA-Sequenz in die Zellen transportiert werden. Der Einbau der polyanionischen DNA in die Liposome wird durch Komplexierung dieser mit kationischen Lipiden unter Bildung von Lipoplexen vereinfacht.<sup>40</sup> Gleichzeitig kann durch Verbindung der DNA mit Polykationen wie Polylysin die Endozytose in die Zellen erleichtert und ein Schutz vor dem Abbau durch Nukleasen hergestellt werden.<sup>39</sup> Nachteil der Verwendung von Liposomen zum Gentransfer besteht ähnlich wie bei den Plasmiden in einer zu geringen Aufnahme der DNA vom Zellkern. Auch hier wird die DNA nicht stabil in die chromosomale DNA integriert. Die geringen Mengen eingeschleuster DNA werden im Zellkern zwar transkribiert und anschließend durch die Translation in das entsprechende Protein umgeschrieben, jedoch bleibt dieser Effekt nur für wenige Tage messbar.

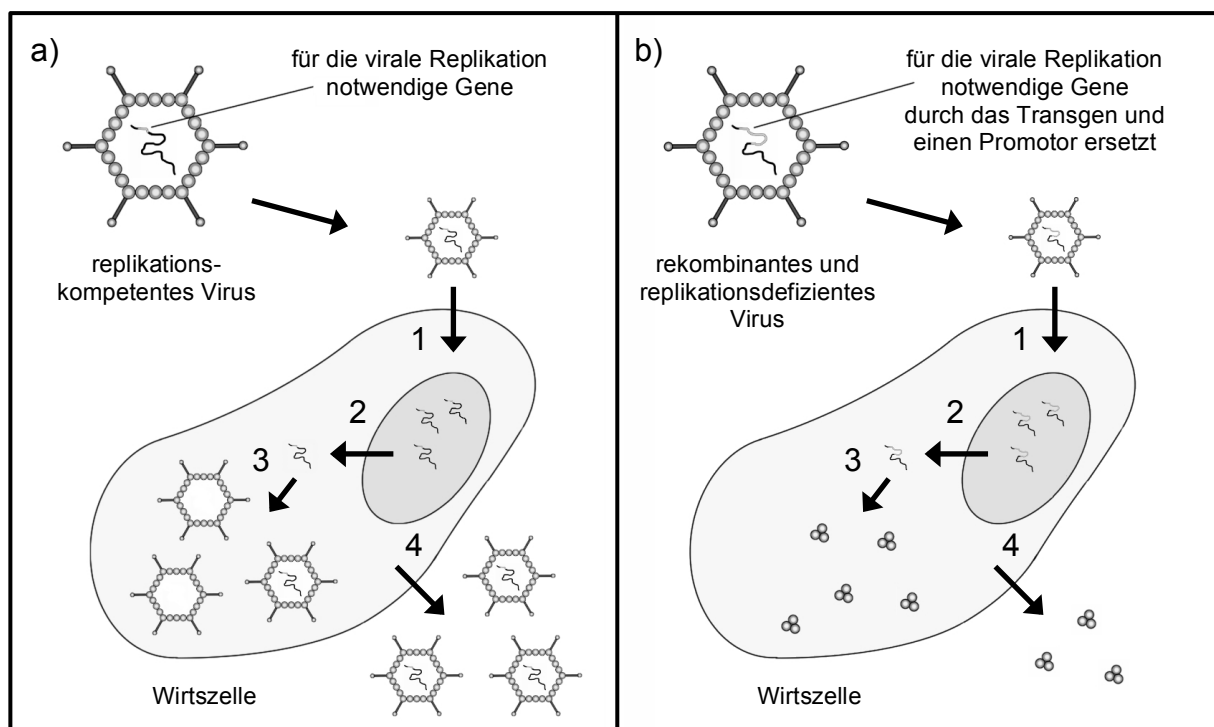




**Abb. 6** a) Lipoplex und b) rekombinantes Plasmid als Vektoren zum Gentransfer

Der virale Gentransfer ermöglicht im Vergleich zum Gebrauch nicht-viraler Vektorsysteme ein sehr effizientes und spezifisches Einschleusen der gewünschten DNA in die zu behandelnden Zellen. Viren bestehen aus Nukleinsäuren, die von einer Protein-Hülle (Kapsid) umgeben sind. Einige besitzen bis zum Beginn der Replikationsphase zusätzlich zum Kapsid eine Virushülle und werden dann als behüllt bezeichnet. Viren besitzen keinen eigenen Stoffwechsel, da sie nicht über ein Zytoplasma mit entsprechenden Bestandteilen wie Ribosomen oder Mitochondrien verfügen. Viren sind daher auf den Syntheseapparat von Wirtszellen angewiesen, um ihre Fortpflanzung gewährleisten zu können. Die Nukleinsäuren der Viren enthalten die Erbinformationen zur Replikation sämtlicher viraler Bestandteile sowie zur Steuerung des Stoffwechsels einer Wirtszelle. Nach Anheftung des Virus an eine Wirtszelle (Adsorption) bringt es seine DNA ins Zellinnere (Injektion). Wird das Virus vollständig mit seinen Hüllstrukturen von der Zelle aufgenommen, muss es vor der Replikation zunächst von diesen befreit werden (uncoating), damit die DNA in den Zellkern gelangen kann. Anschließend kommt es zur Genexpression der Virus-DNA mit Vervielfältigung seiner Nukleinsäuren und Protein-Hüllen. Durch eine

Modifikation des viralen Genoms mit Entfernen der pathogenen Eigenschaften bei gleichzeitigem Einbau fremden genetischen Materials, stellen Viren als Vektoren hocheffiziente Systeme für den Gentransfer dar. Die unerwünschte Pathogenität des Virus zeichnet sich durch seine Vermehrung in der Wirtszelle, Zerstörung dieser durch Freisetzung der neugebildeten Viren und anschließender Infektion weiterer Zellen aus. Durch das Entfernen der für die Replikation notwendigen DNA-Sequenzen kann ein replikationsdefizientes Virus hergestellt werden.<sup>30</sup> Durch gentechnische Verfahren können Viren entsprechend modifiziert werden und liegen dann als rekombinantes Virus vor. Diese sorgen nach Infektion einer Zelle für die Synthese des Proteins, dass durch das klonierte Transgen kodiert ist.



**Abb. 7** a) Infektion eines replikationskompetenten Virus in seine Wirtszelle und b) Infektion eines rekombinanten und replikationsdefizienten Virus in seine Wirtszelle. 1: Eindringen des Virus in die Zelle und Replikation seiner DNA im Zellkern. 2: Nach Transkription der DNA verlässt die mRNA den Zellkern. 3: a) Translation der mRNA mit Bildung viraler Bestandteile. b) Translation der mRNA mit Bildung des vom Transgen kodierten Proteins. 4: a) Die synthetisierten Viren verlassen die Zelle und infizieren weitere Zellen. b) Sekretion der synthetisierten Proteine.

Für den viralen Gentransfer wurden im Laufe der Zeit eine Reihe von Viren untersucht, die als Vektoren in Frage kommen. Wichtige Kriterien bei der Verwendung eines viralen Vektors stellen die Effizienz und die Spezifität der Transduktion, die Dauer der Genexpression sowie eine mögliche Immunantwort des behandelten Gewebes dar. Des Weiteren muss eine effiziente Produktion rekombinanter Viren sowie ein sicheres Arbeiten mit diesen gewährleistet werden.

Retroviren waren in den Anfängen der viralen Gentherapie die am häufigsten verwendeten Vektoren. Sie sind etwa 100 nm große behüllte Viren, die über zwei identische Einzelstrang-RNA Moleküle verfügen. Mittels der reversen Transkriptase werden diese in doppelsträngige DNA-Kopien umgeschrieben und in das Genom der Wirtszelle integriert. Durch die Modifikation des viralen Genoms können die spezifischen pathogenen Eigenschaften des Virus durch die gewünschten Gene ersetzt werden. Allerdings ist es der viralen cDNA nicht möglich durch Kernporen zu translozieren, so dass Retroviren nur teilungsfähige Zellen infizieren können. Lediglich die Untergruppe der Lentiviren ist in der Lage in den Kern von sich nicht teilenden Zellen einzudringen, was das Anwendungsspektrum von Retroviren deutlich limitiert. Die effiziente Verwendung retroviraler Vektoren zum Gentransfer ist daher hauptsächlich auf den Einsatz in vitro beschränkt.<sup>127</sup> Außerdem besteht die Gefahr der Entstehung replikationskompetenter Viren sowie einer malignen Entartung des behandelten Gewebes, was durch das Vorhandensein spezieller Onkogene (v-onc-Gene) begünstigt wird.<sup>126</sup> Trotz guter Transduktionsrate und langanhaltender Genexpression in sich teilenden Zellen, ist der Gebrauch von Retroviren zum Gentransfer durch die geringe Effizienz in vivo für die Untersuchungen dieser Arbeit nicht geeignet.<sup>68</sup>

Herpesviren sind 140 bis 180 nm große behüllte Viren, die über eine lineare doppelsträngige DNA verfügen. Zwar bietet ihr großes Genom ausreichend Kapazität für Transgene und die Viren sind in der Lage auch sich nicht teilende Zellen zu infizieren, jedoch stellt ihr Neurotropismus und die Zytotoxizität einen limitierenden Faktor für die Anwendung in der Gentherapie dar.<sup>56</sup>

Adeno-assoziierte Viren (AAV) aus der Gruppe der Parvoviren sind 18-26 nm kleine unbehüllte Viren, die über eine Einzelstrang-DNA verfügen. AAV gehören zu den abhängigen Viren, da sie auf einen Helfervirus, der die gleiche Zelle befällt, angewiesen sind. Als dieser fungiert ein Adenovirus, der den AAV fehlende Helferproteine zur Verfügung stellt. In Abwesenheit des Adenovirus wird die DNA des AAV in das Genom der Wirtszelle integriert und es liegt eine latente Infektion vor. Sobald Adenoviren anwesend sind, können AAV ihren Zyklus fortsetzen und sich vermehren. AAV sind ebenfalls in der Lage sich nicht teilende Zellen zu infizieren. Außerdem weisen sie geringe Immunogenität und hohe Transduktionsraten auf. Nachteil der Verwendung von AAV als Vektoren zum Gentransfer stellt ihr kleines Genom dar. So dürfte das verwendete Transgen eine Größe von 4,7 kbp nicht überschreiten.

Adenoviren sind 70-90 nm große unbehüllte Viren, die über eine lineare doppelsträngige DNA verfügen. Erstmals konnten sie im Jahr 1953 aus menschlichen Rachenmandeln (Adenoiden) isoliert werden, woher sich ihr Name ableitet.<sup>101</sup> Adenoviren zeichnen sich durch einen besonders effizienten Gentransfer mit hoher Stabilität in vivo und langanhaltender Genexpression aus.<sup>74</sup> Sie sind in der Lage sich nicht teilende und teilende Zellen zu infizieren und weisen nur geringe Pathogenität auf. Die adenovirale DNA wird nach Eindringen in den Zellkern nicht in das Genom der Wirtszelle integriert, so dass nur eine transiente Expression des Transgens zu erzielen ist. Von den über 50 verschiedenen Serotypen weisen alle ein breites Spektrum an Wirtszellen auf, in denen sie sich Fortpflanzen können.<sup>12</sup> Die größte Bedeutung in der Gentherapie besitzt der Serotyp 5.<sup>62</sup> Die Genexpression dieses Virus kann in verschiedene Phasen unterteilt werden, in denen aufeinanderfolgend spezifische Proteine zur Regulation des Replikationszyklus synthetisiert werden. Hierbei wird die sehr frühe Genexpression (immediate early expression), die spätere Genexpression (delayed early expression) und die späte Genexpression (late expression) unterschieden.

Das Gen E1A wird während der frühen Genexpression als erstes exprimiert. Die daraus synthetisierten Proteine 243RE1A und 289RE1A stimulieren die Gene der späteren Genexpression E1B, E2A, E2B, E3 und E4. Diesen kommen wichtige

regulatorische Funktionen zu. So sorgt das durch E1B kodierte Protein 19KE1B durch Komplexbildung mit E1A zur Unterbrechung einer erneuten Kaskade von Genexpressionen.<sup>9</sup> Außerdem gewährleistet es einen Schutz gegen den Abbau der viralen DNA. Die durch E2 kodierten Proteine sind an der Replikation des Virus beteiligt, die ca. sechs bis acht Stunden nach Infektion beginnt und einen Höhepunkt zwischen der 18. und 20. Stunde aufweist.<sup>85</sup> Nach etwa 24 Stunden ist die Replikation beendet. Das durch E3 kodierte Protein Gp19KE3 verhindert die Lyse der infizierten Zelle durch zytotoxische T-Lymphozyten und hat seine Funktion somit in der Immunabwehr des Virus. Dies geschieht durch Komplexbildung mit den HLA-Klasse-1-Proteinkomplexen im endoplasmatischen Retikulum. Des Weiteren sorgen die durch E3 kodierten Proteine zu einer Senkung der durch E1A vermittelten erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Tumornekrosefaktoren und aktivierten Makrophagen.<sup>129</sup>

Um Adenoviren als Vektoren zum Gentransfer verwenden zu können, sind die für die Replikation notwendigen Regionen des viralen Genoms zu entfernen. Gleichzeitig kann ein Transgen kodierend für das gewünschte Protein integriert werden. Die genannten Eigenschaften von Adenoviren machen diese zu sehr effizienten Vektoren zum Gentransfer. Für die Untersuchungen dieser Arbeit wird daher ein rekombinanter und replikationsdefizienter adenoviraler Vektor kodierend für VEGF<sub>165</sub> (AdVEGF) verwendet.

### 1.6.2 AdVEGF in präklinischen und klinischen Studien

Durch die Entdeckung eines Zusammenhangs zwischen VEGF und Nervenregeneration wurden präklinische Studien speziell auf diesem Hintergrund entwickelt.<sup>112</sup> Schwerpunkt der Untersuchungen ist dabei der Einsatz von VEGF zur Behandlung der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS). Neben der direkten Applikation von VEGF in die Nähe des Rückenmarks bei an ALS erkrankten Ratten, wurden auch virale Vektoren zum Gentransfer eingesetzt.<sup>115</sup> So wurde ein Lentivirus aus der Familie der Retroviren kodierend für VEGF untersucht, der nach Muskelinjektion durch retrograden Transport ins Rückenmark das Überleben von an ALS erkrankten Mäusen verlängern konnte.<sup>5</sup> Außer der Verwendung von VEGF bei zentralen

Nervendegenerationen wie der ALS, gibt es auch Untersuchungen zum Effekt einer Gentherapie mit VEGF bei peripheren Nervenschädigungen. Die Applikationsmethoden für VEGF beschränken sich hierbei jedoch häufig auf die Verwendung nackter VEGF-DNA.<sup>95</sup> Zudem konnte die Nervenregeneration bei Ratten durch einen Gentransfer von VEGF-DNA durch Plasmide als Vektoren gefördert werden.<sup>46</sup> Der Einsatz von AdVEGF in präklinischen Studien bei peripheren Nervenverletzungen stellt derzeit ein kaum beforschtes Gebiet dar. Dafür konnten positive Effekte in anderen Bereichen aufgezeigt werden. So förderte die Injektion von AdVEGF in das um Frakturen liegende Muskelgewebe die Knochenheilung bei Ratten.<sup>119</sup> Ebenfalls wurde durch die Verwendung von AdVEGF eine Erhöhung der Überlebensrate überdimensionierter Hautlappen bei Ratten nachgewiesen.<sup>52</sup>

Der Einsatz von AdVEGF wird bereits in verschiedenen klinischen Studien untersucht. Die Hintergründe der Versuche beschränken sich dabei primär auf die angiogenetischen Eigenschaften von VEGF zur Therapie kardiovaskulärer Krankheiten. Bei der REVASC-Studie (Randomized Evaluation of VEGF for Angiogenesis in Severe Coronary Disease) erfolgte eine intramyokardiale Injektion von AdVEGF mit konsekutiver funktioneller und elektrophysiologischer Verbesserung des Herzens.<sup>98</sup> In der RAVE-Studie (Regional Angiogenesis with Vascular Endothelial Growth Factor), einer randomisierten, doppelblinden Phase II Studie, wurde die einmalige Applikation von AdVEGF bei Patienten mit einseitiger Claudicatio intermittens untersucht.<sup>97</sup> Die Auswertungen konnten keinen Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der mit AdVEGF behandelten Versuchsgruppe darlegen. Die KAT II-Studie (Kuopio Angiogenesis Trial II), eine kontrollierte, doppelblinde Phase II Studie, prüfte die Auswirkungen einer an Patienten mit Angina pectoris Grad II-III durchgeführten kathetergesteuerten intrakoronaren Gentherapie mit AdVEGF nach einer perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA).<sup>58</sup> Die mit AdVEGF behandelte Versuchsgruppe konnte eine signifikant erhöhte myokardiale Durchblutung aufweisen. Eine andere randomisierte, doppelblinde Phase II Studie konnte ebenfalls einen positiven Effekt von AdVEGF nach intraarterieller Applikation bei peripheren Ischämien zeigen.<sup>76</sup> Hierbei wurden im Rahmen einer perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA) Patienten mit

---

arteriosklerotischen Stenosen der unteren Extremität mit AdVEGF therapiert. Die behandelten Patienten wiesen im Anschluss eine erhöhte Vaskularisation auf.

### 1.6.3 Einsatz von AdVEGF im Modell der geburtstraumatischen Parese des Plexus brachialis der Ratte

Die Therapie der geburtstraumatischen Plexusparese in der Klinik beschränkt sich derzeit auf die chirurgische Wiederherstellung der neuralen Kontinuität sowie der physiotherapeutischen Behandlung. Durch die Erkenntnisse aus den Untersuchungen zum Einfluss von VEGF auf die Nervenregeneration eröffnen sich jedoch neue Möglichkeiten in der Behandlung. Die Verletzung peripherer Nerven in der frühen postpartalen Periode führt zum konsekutivem irreversiblen Verlust der zugehörigen  $\alpha$ -Motoneuronen im Rückenmark. Der im Rahmen der Forschung zur Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) nachgewiesene protektive Effekt von VEGF auf  $\alpha$ -Motoneurone gibt Anlass zur Untersuchung einer entsprechenden Wirksamkeit bei geburtstraumatischen Verletzungen des Plexus brachialis.

Die Untersuchungen zum Einfluss von VEGF auf die ALS wurden im Modell einer genetisch veränderten Maus (VEGF $\delta/\delta$ -Maus) durchgeführt, die durch reduzierte Expression von VEGF für das Krankheitsbild der ALS prädisponiert war.<sup>90</sup> Der Verlust der  $\alpha$ -Motoneurone wurde somit genetisch induziert. In den Versuchen dieser Arbeit wird die potentielle Degeneration der  $\alpha$ -Motoneurone durch ein innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt durchgeführtes Quetschtrauma der Wurzeln C5 und C6 des Plexus brachialis am Modell der Ratte hervorgerufen. Der neurotrophe und angiogenetische Einfluss von VEGF auf das geschädigte Nervengewebe könnte die Interaktion zwischen reifenden Motoneuronen und ihren Zielstrukturen aufrechterhalten und somit einen Untergang der Motoneurone verhindern. Durch die unmittelbar nach der Verletzung durchgeführte Gentherapie mit Adenoviren als hochpotente und effiziente Vektoren kann eine langanhaltende und hohe Gewebekonzentration von VEGF im behandelten Gewebe erreicht werden.

## 1.7 Zielsetzung

Vor dem Hintergrund der protektiven und regenerativen Wirkung von VEGF auf Nervengewebe, soll die Untersuchung einer verbesserten Nervenregeneration durch adenoviralen Gentransfer von VEGF nach postpartaler Nervenschädigung des Plexus brachialis im Modell der Ratte Ziel dieser Arbeit sein. Dabei liegt der Schwerpunkt in der Beurteilung des zeitlichen Verlaufs der Regeneration der durch den Schaden entstandenen Parese sowie den qualitativen und quantitativen histologischen Unterschieden der mit AdVEGF behandelten Versuchsgruppe im Vergleich zu der mit NaCl 0,9% behandelten Kontrollgruppe. Da die Nervenschädigung nur am linken Plexus brachialis durchgeführt wird, soll die gesunde kontralaterale Seite als unbehandelter Vergleichsparameter innerhalb der Gruppen dienen.

Im Anschluss an die Therapie werden über einen Versuchszeitraum von 13 Wochen Verhaltensuntersuchungen durchgeführt, die eine Beurteilung der Wirksamkeit auf funktioneller Ebene erlauben. Durch die Bestimmung der Konzentration von VEGF im behandelten Gewebe ist die erfolgreiche Gentherapie nachzuweisen. Histologische Untersuchungen des Rückenmarks sollen den Einfluss von AdVEGF auf die  $\alpha$ -Motoneurone im entsprechenden Motoneuron-Pool klären. Des Weiteren wird der Plexus brachialis mikroskopisch nach bestimmten Kriterien untersucht, um einen Effekt auf die periphere Nervenregeneration zu prüfen. Ebenso erfolgt eine Gewichtsbestimmung sowie eine histologische Untersuchung des vom Plexus brachialis innervierten M. deltoideus nach bestimmten Kriterien. Die Ergebnisse sollen zeigen, ob durch den Einsatz von AdVEGF in der Behandlung einer geburtstraumatischen Plexusparese ein Unterschied im Vergleich zu mit NaCl 0,9% behandelten Ratten zu beobachten ist.



---

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Geburtstraumatische Parese des Plexus brachialis der Ratte

#### 2.1.1 Versuchsaufbau

Im Versuchsmodell wurden 18 Sprague-Dawley-Ratten in eine Versuchsgruppe (n=9) und eine Kontrollgruppe (n=9) unterteilt und innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt einer identischen Operation mit Quetschtrauma des linken Plexus brachialis unterzogen. Dabei wurden die Nervenwurzeln C5 und C6 dargestellt und mit einer Mikropinzette 4 Sekunden gequetscht. Dieses Operationsmodell wurde bereits in verschiedenen Untersuchungen zur geburtstraumatischen Parese des Plexus brachialis angewandt und stellt eine gängige Methode dar.<sup>22</sup> Der dabei entstandene Schaden soll eine gleichwertige Verletzung zur geburtstraumatischen Plexusparese darstellen. Jedes Tier aus der Versuchsgruppe erhielt im Anschluss an die Operation eine Injektion mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> in das umliegende Muskelgewebe. Die Kontrollgruppe hingegen erhielt eine Injektion mit NaCl 0,9% in äquivalenter Menge in entsprechendes Gewebe. Die Zuordnung der Tiere in die jeweiligen Gruppen war der Versuchsleitung bis zum Ende der Versuche und deren Auswertung nicht bekannt, so dass folgende Untersuchungen im Rahmen eines doppelblinden Experiments durchgeführt wurden.

#### 2.1.2 Tiere und Tierhaltung

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8 Abs. 1 des deutschen Tierschutzgesetzes vom 30.05.2006 bei der Regierung von Oberbayern angemeldet und gemäß Bescheid der Regierung von Oberbayern vom 21.08.2006 (GZ 55.2-1-54-2531-66-06) genehmigt.

In dieser Studie wurden männliche und weibliche neugeborene Crl:CD(SD)-Ratten mit einem Gewicht zwischen 6,5 g und 8 g verwendet. Die Tiere wurden im Zentrum für präklinische Forschung am Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität

München gezüchtet und geboren. Mutter- und Vattertier stammen aus den Charles River Laboratorien, Sulzfeld. Der Wurf wurde postoperativ für 4 Wochen bei der Mutter aufgehoben. Nach dem Säugen wurden die Ratten zu zweit in Makrolon-Standardkäfigen vom Typ III gehalten. Futter (Rattenpellets 1320, Altromin GmbH, Lage) und Wasser (Trinkwasser aus Nippeltränken bei täglichem Wechsel) erhielten die Tiere ad libitum. Gemäß den Vorgaben zur Versuchstierhaltung wurden die Tieren in speziellen Tierhaltungsräumen gehalten. Der Tag-Nacht-Rhythmus mit jeweils 12-stündigen Hell- und Dunkelphasen wurde durch automatische Beleuchtungssteuerung mit einer Lichtintensität bis 100 lx simuliert. Die Raumtemperatur betrug 20-25°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 60-70%.

Die Narkose erfolgte medikamentös durch intramuskuläre Injektion mit 1 mg/kg KG Medetomidin (Domitor<sup>®</sup>, Orion Corporation, Espoo, Finnland), 20 mg/kg KG Midazolam (Dormicum<sup>®</sup>, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen) und 20 mg/kg KG Ketamin (Narketan<sup>®</sup>, Chassot GmbH, Ravensburg). Als Antidot zum Medetomidin wurde 0,04 mg/kg KG Atipamezol (Antisedan<sup>®</sup>, Orion Corporation, Espoo, Finnland) verwendet.

Die Euthanasie der Ratten erfolgte nach Anästhesie mit Isofluran (Attane<sup>™</sup> Isoflurane, Provet AG, Lyssach, Schweiz) durch intramuskuläre Injektion mit 100 mg/kg KG Ketamin (Narketan<sup>®</sup>, Chassot GmbH, Ravensburg) und 10 mg/kg KG Xylazin (Rompun<sup>®</sup>, Bayer, Leverkusen).

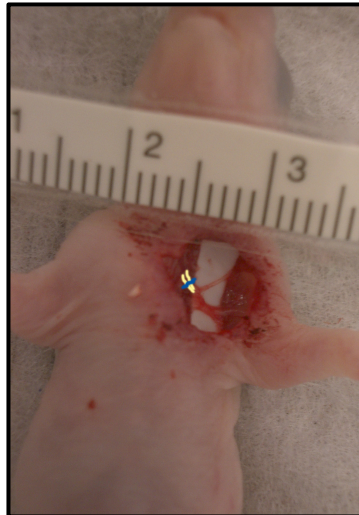
### 2.1.3 Operation

Die Tiere wurden wie beschrieben narkotisiert und unter sterilen Bedingungen auf einem quadratischen Tupfer auf einer Heizmatte mit einer Temperatur von 37°C fixiert. Der Operationsbereich wurde rasiert, gesäubert und desinfiziert. Die Inzision erfolgte caudal der Klavikula. M. pectoralis major und M. pectoralis minor wurden im Faserverlauf gespalten (Skalpellklingen Nr. 15, Fa. Aesculap, Tuttlingen). Als oberflächliche Leitstruktur diente die Vena cephalica, die oberhalb der Inzision liegt. Die Präparation erfolgte stumpf unter Schonung der umliegenden Gefäße weiter in die Tiefe bis zum Plexus brachialis (Abb. 9). Dieser wurde von den Trunci bis zu den

Wurzeln hin präpariert. Die Nervenwurzeln C5 und C6 wurden dargestellt und mit einer Mikropinzette 4 Sekunden gequetscht. Der Verschluss der Wunde (Abb. 10) erfolgte durch eine Naht mit Prolene® 6-0 (Fa. Ethicon Products, Norderstedt).



**Abb. 8** Neugeborenes



**Abb. 9** Plexusdarstellung (Sektionspräparat)



**Abb. 10** Wundverschluss

## 2.2 Gentherapie mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> am operierten Modell

### 2.2.1 Kultivierung und Gewinnung von AdCMV.VEGF<sub>165</sub>

Die Herstellung des Virus erfolgte durch das Institut für Virologie und Immunologie am Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München. Bei AdCMV.VEGF<sub>165</sub> handelt es sich um ein rekombinantes und replikationsdefizientes Adenovirus vom Serotyp 5, das die cDNA der humanen VEGF-Isoform 165 als Transgen trägt. Als vorangestellter Promotor zum Erreichen einer hohen Genexpression diente ein konstitutiver Zytomegalievirus (CMV)-immediate-early Promotor.<sup>84</sup>

Bei den zur Amplifikation des Virus verwendeten HEK 293 Zellen (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) handelt es sich um eine kontinuierliche primäre humane embryonale Nierenzelllinie. Diese wurde mit Fragmenten des humanen Adenovirus Typ 5 transformiert und exprimiert entsprechend E1-

Proteine.<sup>53</sup> Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte in Brutschränken (Fa. Life Sciences International, Frankfurt) bei einer Temperatur von 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5%.

Die Zellen wurden nach Infektion für 36 Stunden kultiviert. Der virale Vektor konnte anschließend durch Ultrazentrifugation und Dialyse vom Rest der Zellen getrennt und somit gewonnen werden. Um eine quantitative Messung der biologischen Aktivität des Virus zu ermöglichen, wurde im Anschluss eine Titerbestimmung mittels Plaque-Tests durchgeführt. Ebenso konnte eine Replikationsdefizienz durch Deletion der E1A-Region nach Vermehrung des Vektors in HEK 293 Zellen mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion sichergestellt werden. Der aus dieser Versuchsreihe hervorgegangene adenovirale Vektor AdCMV.VEGF<sub>165</sub>, der die Produktion von VEGF<sub>165</sub> im Zielgewebe induziert, wurde für die Versuche dieser Arbeit verwendet.

### 2.2.2 Injektionsmodell

Im Rahmen eines doppelblinden Experiments wurden die verwendeten Spritzen (Codan medical, Rødby, Denmark; Kanülen: Microlance™ 36G, Fa. Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden) vor der Injektion in Abwesenheit des Versuchsleiters für jedes Tier mit einer Nummer markiert und einer dem Inhalt entsprechenden Behandlungsgruppe zugeordnet. Das Füllvolumen der Spritzen betrug in beiden Gruppen 20µl und war optisch nicht voneinander zu unterscheiden. Die Nummerierung der Spritzen sowie dessen Inhalt ließen für den Versuchsleiter keinen Rückschluss darauf zu, ob das behandelte Tier der Versuchsgruppe oder der Kontrollgruppe zuzurechnen war.

Nach erfolgreicher Operation wurden den Tieren der Versuchsgruppe (n=9) jeweils 10<sup>7</sup> pfU AdCMV.VEGF<sub>165</sub> in einem Volumen von 20µl intramuskulär injiziert. Den Tieren der Kontrollgruppe (n=9) wurden jeweils 20µl NaCl 0,9% (Fa. Merck, Darmstadt) intramuskulär injiziert. In beiden Gruppen erfolgte die Injektion an festgelegten Stellen in das dem Plexus brachialis umliegende Muskelgewebe.

---

## 2.3 Verhaltensuntersuchungen

### 2.3.1 Übersicht und Bewegungseinschränkungen

Der Wurf wurde postoperativ für zwei Wochen bei der Mutter aufgehoben bevor mit den Verhaltensuntersuchungen begonnen werden konnte. Diese wurden dann ab der dritten Woche nach der Operation in einem Abstand von zwei Wochen bis zur 13. Woche nach der Operation durchgeführt. Der Versuchszeitraum belief sich somit auf 11 Wochen. Bei den Untersuchungen, bestehend aus Grid-Walk-Test, Hebe-Test und Grooming-Test soll eine Beurteilung des Verlaufs der Regeneration der durch den Schaden entstandenen Parese auf funktioneller Ebene ermöglicht werden. Um den Tieren zwischen den verschiedenen Tests Zeit zur Erholung geben zu können, wurden diese an unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Alle Tests machen eine Aussage über die motorischen Fähigkeiten der behandelten Tiere in Bezug auf Einschränkungen des Bewegungsapparats der oberen Extremität. Dabei wurden die Bewegungen der operierten Seite mit der kontralateralen gesunden Seite verglichen.

Das in dieser Arbeit durchgeführte Quetschtrauma der Nervenwurzeln C5 und C6 führt zu einer Erb'schen Parese, die ein spezifisches klinisches Bild mit eingeschränkter motorischer Bewegungsfähigkeit aufweist. Im Vordergrund steht hier die durch die Parese des N. axillaris eingeschränkte Abduktion im Schultergelenk durch den M. deltoideus sowie die durch die Parese des N. musculocutaneus eingeschränkte Flexion im Ellenbogengelenk durch den M. biceps brachii. Die Parese des N. suprascapularis führt zu einer Einschränkung der Außenrotation im Schultergelenk durch den M. infraspinatus. Dies führt zu einem Ungleichgewicht im Schultergelenk mit Überwiegen der Innenrotation durch den M. latissimus dorsi. Gleichzeitig kommt es zu einem Ungleichgewicht im Ellenbogengelenk mit Überwiegen der Extension durch den M. triceps brachii. Die durchgeführten Verhaltensuntersuchungen sind darauf ausgelegt, die spezifischen Bewegungen, die durch die Parese der entsprechenden Nerven eingeschränkt sind, zu prüfen.

### 2.3.2 Grid-Walk-Test

Um latente Defizite des Gleichgewichts und insbesondere der Motorik der oberen Extremität untersuchen zu können, wurde das Bewegungsmuster der Ratten am Vorbild des Grid-Walk-Tests beobachtet.<sup>78</sup> Ohne postoperatives Training mussten die Ratten eine 80 cm lange und 1 m über dem Boden horizontal ausgerichtete Leiter mit einem Sprossenabstand von 2 cm überqueren. Dabei wurde jeder Fehltritt sowie suchende Bewegungen der linken und rechten Vorderpfote gezählt. Dieser Test wurde mit jedem Tier mindestens drei Mal pro Versuchswoche durchgeführt. Anschließend wurde der Mittelwert aus den drei Versuchen berechnet und dokumentiert.

### 2.3.3 Hebe-Test

Dieser objektive Verhaltenstest bietet eine einfache quantitative Methode zur Beurteilung funktionaler Genesung der oberen Extremität.<sup>17</sup> Hierbei wurden die Ratten vorsichtig am Schwanz angehoben und über eine mit einem Griff ausgestattete Messvorrichtung gehalten, die eine Aufzeichnung der Zugkraft (in Gramm) ermöglicht. Die frei in der Luft tastenden Vorderpfoten fassten dabei den Griff und wurden dann soweit angehoben, bis sie den Halt verloren. Die Messvorrichtung zeichnete den höchsten zuletzt gemessenen Wert vor dem Loslassen auf und gab somit Auskunft über die maximale Kraft der Greifbewegung. Dieser Test wurde abwechselnd mit der linken und rechten Vorderpfote mindestens drei Mal pro Versuchswoche durchgeführt. Anschließend wurde der Mittelwert aus den drei Versuchen berechnet und dokumentiert.

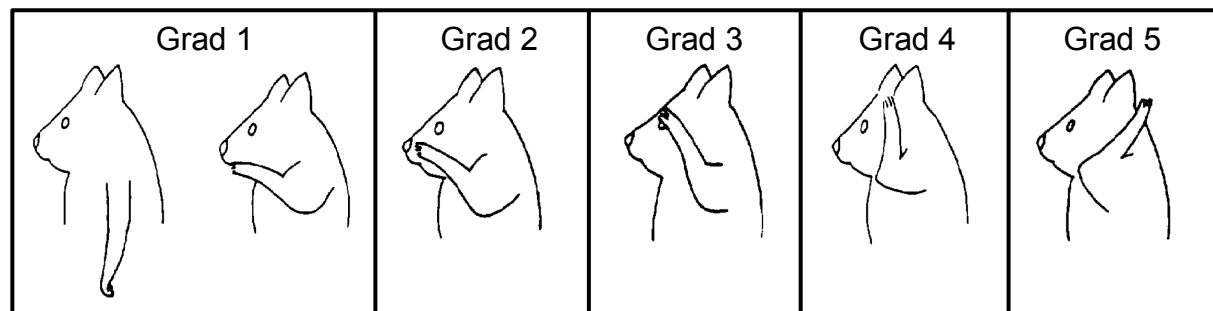
### 2.3.4 Grooming-Test

Bewegungsmuster der oberen Extremität können mit Hilfe des Grooming-Tests beurteilt werden.<sup>16</sup> Durch Applikation süßen Sirups auf die Schnauze der Ratten wird eine reflexartige, bilaterale Bewegung der Vorderpfoten über den Kopf verursacht. Dabei kann eine genaue Bewertung der Abduktion und der Ellenbogenflexion durch eine Einteilung in verschiedene Grade erfolgen (Abb. 11). Das Bewegungsmuster

wurde seitenvergleichend mit Verwendung eines nicht-parametrischen Wertesystems beurteilt und dokumentiert.

Einteilung	Bewegungsmuster der Vorderpfote
Grad 1	führt keine Bewegung aus oder reicht bis zum Mund
Grad 2	reicht bis zur Region unterhalb des Auges
Grad 3	reicht bis zum Auge
Grad 4	reicht bis vor die Ohren
Grad 5	reicht bis hinter die Ohren

**Tab. 2** Wertesystem zur Beurteilung des Bewegungsmusters im Grooming-Test



**Abb. 11** Schematische Darstellung der Bewegungsmuster

## 2.4 Untersuchung des M. deltoideus

### 2.4.1 Gewebeentnahme

Die Entscheidung für die Entnahme des M. deltoideus mit anschließender Gewichtsbestimmung und histologischer Untersuchung basiert auf der Tatsache, dass dieser ein Kennmuskel der Segmente C5 und C6 ist, dessen Wurzeln im Rahmen der Operation gequetscht wurden. Die Euthanasie der Ratten erfolgte wie beschrieben abhängig vom Geburtsdatum zwischen dem 8. und 10. Lebensmonat am selben Tag. Im Anschluss wurde der Brustkorb eröffnet, das Herz aufgesucht und die Tiere mit einer Fixationslösung (Formalin) durchspült. Es folgte die Darstellung und schonende Entnahme des M. deltoideus beidseits. Hierbei wurde der Muskel vollständig mit seinen proximalen Anteilen von Klavikula und Scapula

sowie den distalen Anteilen vom Humerus mit dem sehnigen Ansatz abgelöst. Um eine Vergleichbarkeit zu schaffen, wurde der Muskel bei jedem Tier auf die gleiche Weise präpariert und entnommen.

#### 2.4.2 Gewichtsbestimmung

Unmittelbar nach Entnahme des M. deltoideus wurde dieser auf einer Waage (Modell MC1 RC210P, Fa. Sartorius, Göttingen) gewogen. Es erfolgte die Gewichtsbestimmung (in Gramm) des linken und rechten Muskels aller Tiere mit anschließender Dokumentation der Daten. Für jede Behandlungsgruppe wurde der Quotient aus der Summe der Werte der rechten Seite durch die Summe der Werte der linken Seite berechnet. Das Ergebnis soll Aufschluss über das Ausmaß der Muskelatrophie im Rahmen der durch die Plexusparese entstandenen Denervation geben. Die zu erwartende Muskelatrophie tritt in zeitlicher Verzögerung zum Nervenschaden auf. Durch die Verhaltensuntersuchungen konnte bereits eine mögliche Regeneration der Nerven und somit eine verbesserte Funktionalität der Muskeln über einen bestimmten Zeitraum beobachtet werden. Die Gewichtsbestimmung erfolgte zu einem Zeitpunkt, an dem bereits ein Rückgang der Atrophie durch Reinnervation des Muskels zu erwarten war. Die Ergebnisse gaben somit eine Auskunft über das Ausmaß der nervalen Regeneration der mit AdVEGF behandelten Versuchsgruppe im Vergleich zu der mit NaCl 0,9% behandelten Kontrollgruppe. Im Anschluss an die Gewichtsbestimmung wurden die Muskeln in für jedes Tier entsprechend markierte Eppendorf-Reaktionsgefäße (Typ 3810X, Fa. Eppendorf, Hamburg) zur histologischen Aufarbeitung in Formalin eingelegt.

#### 2.4.3 Histologische Untersuchung

Die in dieser Arbeit durchgeführten histologischen Untersuchungen erfolgten unter Leitung von Prof. Matiassek an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die in Formalin eingelegten Präparate des M. deltoideus wurden mit einer Rasierklinge (Typ 8812 Single Edge Razor Blade, Fa. ATD Tools, Wentzville, USA) zentral an der breitesten Stelle des Muskelbauchs im Querschnitt durchtrennt. Die zwei Hälften wurden dann in für jedes Tier entsprechend markierte

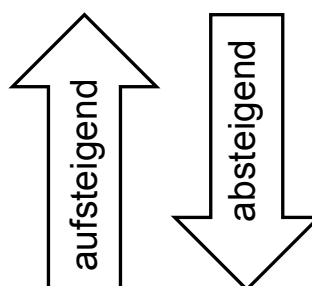


Einbettkassetten gelegt. Vor der Einbettung in Paraffinwachs wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Tab. 3) entwässert. Anschließend wurde der Alkohol durch ein Intermedium (Xylol 100%) entfernt und dieses durch heißes Paraffinwachs ersetzt. Die Präparate wurden danach in ihren Einbettkassetten mit heißem Paraffin überschichtet und zu einem Block verarbeitet, wobei die Einbettkassette den Blockträger bildete. Die zwei Hälften wurden dabei so angeordnet, dass die zu schneidende Fläche, in diesem Fall der Muskelquerschnitt, auf dem Boden lag.

Nach Erkalten des Paraffins standen die Blöcke zum Schneiden zur Verfügung. Die Gewebsschnitte erfolgten mit einem halbautomatischen Rotationsmikrotom (Jung RM2055, Fa. Leica, Wetzlar) in einer Dicke von 6 µm. Durch die beschriebene Anordnung der Präparate in den Blöcken befand sich der Querschnitt des Muskels in der Schnittebene. Von jedem Tier wurde ein Schnitt beider Muskelhälften jeweils von der linken und rechten Seite angefertigt, die für die folgenden Untersuchungen verwendet wurden. Nach Aufzug der Schnitte auf fettfreie Objektträger wurden diese in einem Brutschrank bei 37°C zum Trocknen aufbewahrt.

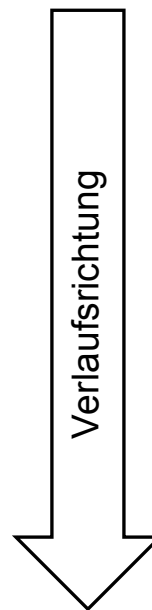
Nach dem Trocknen im Brutschrank wurden die Schnitte für 2 x 10 min. in Xylol 100% entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe (Tab. 3) in ein wässriges Milieu überführt. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (Tab. 4), die eine gute Übersicht der zellulären Bestandteile bietet und auf dem Prinzip der Elektroadsorption beruht. Durch die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) werden die Kernbestandteile der Zellen blau und das Zytoplasma rot gefärbt.

Alkoholreihe	Einwirkungsdauer
Ethanol 100%	5 min.
Ethanol 96%	5 min.
Ethanol 70 %	5 min.
Ethanol 50 %	5 min.



**Tab. 3** Ablauf der Alkoholreihe

Medium	Einwirkzeit
Hämalaunlösung	4 min.
Leitungswasser	10 min.
Eosinlösung 1%	30 s.
Ethanol 50 %	10 s.
Ethanol 70%	10 s.
Ethanol 96%	10 s.
Ethanol 100%	10 s.
Isopropanol 100%	10 s.
Xylol 100%	2 x 10 min.



**Tab. 4** Ablauf der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach der Färbung wurden die Präparate eingedeckt und konnten unter dem Lichtmikroskop (Axio Scope, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) ausgewertet werden. Die Auswertung der jeweiligen Schnitte erfolgte nach festgelegten Kriterien, die eine Beurteilung der Muskelfaserdichte, der Homogenität der Muskelfasergröße, der Mikrofaszikelbildung, der perimysialen Fibrose, der Fettgewebsbildung sowie den Entzündungsreaktionen in verschiedene Grade ermöglichen (Tab. 5). Die Grade (0-3) stehen für die Ausprägung des entsprechenden Kriteriums. Diese Einteilung erlaubt eine bestmögliche Aussage über die morphologischen Unterschiede auf histologischer Ebene treffen zu können. Dabei wurden von jedem Tier die linke und rechte Seite des M. deltoideus miteinander verglichen. Letztendlich soll der Vergleich der operierten linken Seite zwischen der mit AdVEGF behandelten Versuchsgruppe und der mit NaCl 0,9% behandelten Kontrollgruppe Aufschluss über den Therapieeffekt geben. Dies wird dadurch ermöglicht, dass sich die Auswirkungen des erzeugten Nervenschadens sowie die anschließende Regeneration in den genannten Kriterien im Muskelpräparat widerspiegeln und somit das Ausmaß des Effekts beurteilt werden kann.

Kriterium	Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3
Muskelfaserdichte	stark	deutlich	gering	kaum
Homogenität Fasergröße	stark	deutlich	gering	kaum
Mikrofaszikelbildung	keine	gering	deutlich	stark
Perimysiale Fibrose	keine	gering	deutlich	stark
Fettgewebsbildung	keine	gering	deutlich	stark
Entzündungsreaktion	keine	gering	deutlich	stark

**Tab. 5** Ausprägung der Kriterien in Grade

Die Kriterien Muskelfaserdichte und Homogenität der Muskelfasergröße beziehen sich jeweils auf die Gesamtheit des Muskelquerschnitts. Um die Ausprägung der übrigen Kriterien auf das Vorkommen im Präparat genauer beschreiben zu können, wurde für diese eine zusätzliche Einteilung in fokal (1), multifokal (2) oder diffus (3) auftretend vorgenommen. Dieser Wert wurde mit dem entsprechenden Grad (0-3) multipliziert. Anschließend wurden alle Werte eines Schnitts addiert. Je höher dieses Ergebnis ausfiel, desto stärker war die Degeneration des Muskels ausgeprägt. Folglich bedeutet dies eine geringer stattgefundenen Regeneration der peripheren Nerven.

## 2.5 Untersuchung des Plexus brachialis

### 2.5.1 Gewebeentnahme

Die nach Entnahme des Plexus brachialis durchgeführten Untersuchungen sollen zum einen Aufschluss über die morphologischen Veränderungen der peripheren Nerven auf histologischer Ebene geben und zum anderen durch die Quantifizierung der VEGF-Expression die erfolgreiche Gentherapie nachweisen. Die beidseitige Entnahme des Plexus brachialis wurde bei jedem Tier am selben Tag wie die Entnahme des M. deltoideus durchgeführt. Die Euthanasie der Ratten erfolgte wie beschrieben. Im Anschluss wurde der Brustkorb eröffnet, das Herz aufgesucht und die Tiere mit einer Fixationslösung (Formalin) durchspült. Es folgte die Darstellung

und schonende Entnahme des Plexus brachialis sowie dem umliegenden Hüllgewebe beidseits. Danach wurden die Präparate in für jedes Tier entsprechend markierte Eppendorf-Reaktionsgefäße (Typ 3810X, Fa. Eppendorf, Hamburg) zur histologischen Aufarbeitung in Formalin eingelegt.

### 2.5.2 Histologische Untersuchung

Die in Formalin eingelegten Präparate des Plexus brachialis wurden mit einer Rasierklinge (Typ 8812 Single Edge Razor Blade, Fa. ATD Tools, Wentzville, USA) zentral in der Mitte im Querschnitt durchtrennt. Die zwei Hälften wurden dann in für jedes Tier entsprechend markierte Einbettkassetten gelegt. Die Einbettung in Paraffinwachs sowie die Herstellung der Blöcke erfolgte bei diesen Präparaten auf die gleiche Weise wie beim *M. deltoideus*. Auch hier wurden die zwei Hälften so angeordnet, dass die zu schneidende Fläche, in diesem Fall der Querschnitt des Plexus, auf dem Boden lag.

Nach Erkalten des Paraffins standen die Blöcke zum Schneiden zur Verfügung. Die Gewebsschnitte erfolgten mit einem halbautomatischen Rotationsmikrotom (Jung RM2055, Fa. Leica, Wetzlar) in einer Dicke von 6 µm. Durch die beschriebene Anordnung der Präparate in den Blöcken befand sich der Querschnitt des Plexus in der Schnittebene. Von jedem Tier wurde ein Schnitt beider Plexushälften jeweils von der linken und rechten Seite angefertigt, die für die folgenden Untersuchungen verwendet wurden. Nach Aufzug der Schnitte auf fettfreie Objektträger wurden diese in einem Brutschrank bei 37°C zum Trocknen aufbewahrt.

Nach dem Trocknen im Brutschrank wurden die Schnitte für 2 x 10 min. in Xylol 100% entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe (Tab. 3) in ein wässriges Milieu überführt. Es erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE), die in den gleichen Schritten wie beim *M. deltoideus* (Tab. 4) durchgeführt wurde. Diese Methode der Färbung wurde gewählt, um eine gute Übersicht der Morphologie des Plexusgewebes zu erhalten. Nach der Färbung wurden die Präparate eingedeckt und konnten unter dem Lichtmikroskop (Axio Scope, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) ausgewertet werden. Die folgende Auswertung der Schnitte erfolgte wie beim *M.*

deltoideus nach festgelegten Kriterien. Diese ermöglichen eine Beurteilung der Nervenfaserdichte, der Homogenität der Nervenfasergröße, der Gefäßdichte, der erkennbaren Faserdegeneration durch Auftreten von Vakuolen, der epineuralen Fibrose sowie den Entzündungsreaktionen in verschiedene Grade (Tab. 6). Auch hier stehen die Grade (0-3) für die Ausprägung des entsprechenden Kriteriums. Genau wie beim M. deltoideus erlaubt auch diese Einteilung eine sehr genaue Aussage über die morphologischen Unterschiede auf histologischer Ebene treffen zu können. Von jedem Tier wurden die linke und rechte Seite des Plexus brachialis miteinander verglichen. Der Vergleich der operierten linken Seite zwischen der mit AdVEGF behandelten Versuchsgruppe und der mit NaCl 0,9% behandelten Kontrollgruppe soll einen Aufschluss über den Therapieeffekt unmittelbar am peripheren Nerven selbst geben.

Kriterium	Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3
Nervenfaserdichte	stark	deutlich	gering	kaum
Homogenität Fasergröße	stark	deutlich	gering	kaum
Gefäßdichte	stark	deutlich	gering	kaum
Auftreten von Vakuolen	keine	gering	deutlich	stark
Epineurale Fibrose	keine	gering	deutlich	stark
Entzündungsreaktion	keine	gering	deutlich	stark

**Tab. 6** Ausprägung der Kriterien in Grade

Die Kriterien Nervenfaserdichte, Homogenität der Nervenfasergröße und Gefäßdichte beziehen sich jeweils auf die Gesamtheit des Plexusquerschnitts. Um die Ausprägung der übrigen Kriterien auf das Vorkommen im Präparat genauer beschreiben zu können, wurde für diese eine zusätzliche Einteilung in fokal (1), multifokal (2) oder diffus (3) auftretend vorgenommen. Dieser Wert wurde mit dem entsprechenden Grad (0-3) multipliziert. Anschließend wurden alle Werte eines Schnitts addiert. Je höher dieses Ergebnis ausfiel, desto stärker war die Degeneration des Plexus ausgeprägt.

### 2.5.3 Quantifizierung der VEGF-Expression durch Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Um die erfolgreiche Gentherapie mit VEGF im behandelten Gewebe nachweisen zu können, wurde ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt. Damit war es möglich, den Plexus brachialis auf seinen VEGF-Gehalt zu untersuchen. Die adenovirale Gentherapie mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> bewirkte im behandelten Gewebe eine VEGF-Expression über einen limitierten Zeitraum. Um den VEGF-Gehalt daher zu einem möglichst frühen Zeitpunkt nach der Therapie bestimmen zu können, erfolgte die Plexusentnahme in diesem Fall bereits eine Woche nach der Operation. Die Entnahme erfolgte bei Ratten, die zusätzlich zu den 18 Tieren der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe mitoperiert und behandelt wurden. Dabei handelte es sich um insgesamt 4 Ratten, von denen 2 mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> therapiert wurden und somit der Versuchsgruppe angehörten. Die anderen 2 Ratten erhielten NaCl 0,9% in äquivalenter Menge und dienten somit als Kontrollgruppe. Die Injektion wurde im Rahmen der Therapie der 18 Versuchstiere in analoger Weise durchgeführt. Im Anschluss wurden die Tiere entsprechend markiert. Nach einer Woche erfolgte die Euthanasie der 4 Tiere mit anschließender Entnahme des Plexus brachialis. Dabei wurde den Tieren der Versuchsgruppe jeweils der linke Plexus und den Tieren der Kontrollgruppe jeweils der linke und rechte Plexus entfernt (Tab. 7). Da die Gentherapie nur an der linken Seite stattgefunden hat, wurde bei der Versuchsgruppe lediglich der linke Plexus entfernt. Die insgesamt 6 Präparate wurden dann in Alufolie eingeschlagen, entsprechend markiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Präparate	Versuchsgruppe	Kontrollgruppe
Plexus links	2	2
Plexus rechts	-	2

**Tab. 7** Auflistung der entnommenen Plexuspräparate

Bevor die Gewebeproben mittels ELISA untersucht werden konnten, mussten sie homogenisiert werden. Zunächst erfolgte die Gewichtsbestimmung der einzelnen Präparate auf einer Waage (Modell MC1 RC210P, Fa. Sartorius, Göttingen). Sechs Eppendorf-Reaktionsgefäße (Typ 3810X, Fa. Eppendorf, Hamburg) wurden mit 250µl Zirconia/Silica Perlen (BioSpec, Bartlesville, USA) und 250µl Zelllysate-Puffer befüllt. Anschließend wurden die Gewebeproben in die Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und bei 4200 rpm für 1 x 20 s. und danach für 2 x 10 s. in der Zentrifuge (Fast Prep® FP 120 cell disrupter, Fa. Qbiogene, Carlsbad, USA) homogenisiert. Zwischen den einzelnen Vorgängen wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße auf Eis gelagert. Danach erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 14000 rpm für 15 min. bei 4°C. Der Überstand wurde abpipettiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Nach dem Auftauen wurden die Proben bei 14000 rpm für 15 min. bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und weiterverwendet. Die Quantifizierung des VEGF-Gehalts wurde mit einem humanen VEGF ELISA Kit (RayBiotech, Norcross, USA) durchgeführt. Bei diesem ist ein monoklonaler Antikörper spezifisch für humanes VEGF auf dem Boden einer Mikroplatte gebunden. Nach Pipettieren der homogenisierten Gewebeproben auf die Mikroplatte band das in den Proben enthaltene VEGF an diesen fixierten Antikörper. Nicht gebundene Anteile wurden durch Waschen entfernt. Ein enzymgebundener Sekundärantikörper wurde hinzugegeben, dessen ungebundene Anteile wiederum durch Waschen entfernt wurden. Eine Substratlösung, die an die enzymgebundenen Sekundärantikörper bindet, wurde als Indikator hinzugegeben. Die Intensität des Farbumschlags war der Menge an gebundenem VEGF proportional. Die Farbintensität konnte nun gemessen und mit der Intensität einer gleichzeitig untersuchten Standard-Verdünnungsreihe mit bekannter VEGF-Konzentration verglichen werden.

Die Farbintensität wurde durch Messung der optischen Dichte im Densitometer (Biolumin 960 Microplate Reader, Fa. Molecular Dynamics, Tokyo, Japan) bestimmt. Die Ablesung wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Wellenlängenkorrektur von 550 nm durchgeführt, um optische Fehler durch die

verwendete Mikroplatte auszugleichen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels MikroWin 2000 Software (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath).

## 2.6 Untersuchung des Rückenmarks

### 2.6.1 Gewebeentnahme

Die Entnahme des Rückenmarks mit der anschließenden histologischen Untersuchung eines vom Nervenschaden betroffenen Segments soll Aufschluss über die Degeneration der Motoneurone im Vorderhorn geben. Zunächst erfolgte die Entnahme der Wirbelsäule. Diese wurde am selben Tag wie die Entnahme des M. deltoideus und des Plexus brachialis durchgeführt. Die Euthanasie der Ratten erfolgte wie beschrieben. Im Anschluss wurde der Brustkorb eröffnet, das Herz aufgesucht und die Tiere mit einer Fixationslösung (Formalin) durchspült. Es erfolgte die Darstellung und schonende Entnahme der Wirbelsäule bei jedem Tier durch Absetzen dieser direkt unterhalb des Kopfs bis auf Höhe der mittleren thorakalen Wirbelsäule (Th6). Danach wurden die Präparate in für jedes Tier entsprechend markierte verschließbare Gewinde-Reagenzgläser (Schott, Mainz) zur Weiterverarbeitung in Formalin eingelegt.

Da Gewebepräparate, die Knochen enthalten, vor dem Schneiden mit dem Mikrotom aufwendig entkalkt werden müssten, wurde hier das Rückenmark mit Hilfe eines Seitenschneiders vorsichtig aus der knöchernen Wirbelsäule freipräpariert. Während der Präparation wurde die proximale und distale Grenze des Segments C5 aufgrund seiner anatomischen Lage zum 4. Halswirbelkörper auffindig gemacht und mit Fäden markiert. Bei der Entnahme des Rückenmarks wurde darauf geachtet, dass die aus jedem Segment abzweigenden Spinalnerven geschont werden und ihre Stümpfe erhalten bleiben. Durch die Zählung der Abgänge der Spinalnerven von proximal nach distal konnte die markierte Lage des Segments C5 zusätzlich bestätigt werden.



---

### 2.6.2 Histologische Untersuchung

Das entnommene Rückenmark wurde nun an den markierten Stellen mit einer Rasierklinge (Typ 8812 Single Edge Razor Blade, Fa. ATD Tools, Wentzville, USA) im Querschnitt durchtrennt und so das Segment C5 isoliert. Dieses wurde dann in für jedes Tier entsprechend markierte Einbettkassetten gelegt. Die Einbettung in Paraffinwachs sowie die Herstellung der Blöcke erfolgte bei diesen Präparaten auf die gleiche Weise wie beim M. deltoideus und beim Plexus brachialis. Das Segment wurde dabei so angeordnet, dass die zu schneidende Fläche, in diesem Fall die Unterseite, auf dem Boden lag.

Nach Erkalten des Paraffins standen die Blöcke zum Schneiden zur Verfügung. Die Gewebsschnitte erfolgten mit einem halbautomatischen Rotationsmikrotom (Jung RM2055, Fa. Leica, Wetzlar) in einer Dicke von 5 µm. Durch die beschriebene Anordnung des Präparats in den Blöcken befand sich der Querschnitt des Segments in der Schnittebene. Von jedem Tier wurden drei Schnitte des Segments C5 angefertigt, die für die folgenden Untersuchungen verwendet wurden. Nach Aufzug der Schnitte auf fettfreie Objektträger wurden diese in einem Brutschrank bei 37°C zum Trocknen aufbewahrt.

Nach dem Trocknen im Brutschrank wurden die Schnitte für 2 x 20 min. in Xylol 100% entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe (Tab. 3) in ein wässriges Milieu überführt. Anschließend wurden die Schnitte über eine Aufhängung in einen Plastikbehälter mit 450 ml destilliertem Wasser, 41 ml PBS-Puffer (Tab. 8) und 9 ml Citrat-Puffer getaucht. Bei 800 W wurde der Inhalt des Behälters in der Mikrowelle zum kochen gebracht und dann für weitere 20 min. bei 250 W erhitzt. Nach dem Abkühlen für 30 min. auf Raumtemperatur wurde die Aufhängung mit den Schnitten für 3 x 5 min. in eine Glasschale mit PBS-Puffer getaucht. Es folgte die Aufhängung der Schnitte in ein mit 100 ml Methanol und 3 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% gefülltes Glasgefäß für 30 min. Dies diente der Hemmung der sich im Gewebe befindenden Enzyme. Sodann wurden die Schnitte erneut für 3 x 5 min. in PBS-Puffer gereinigt.

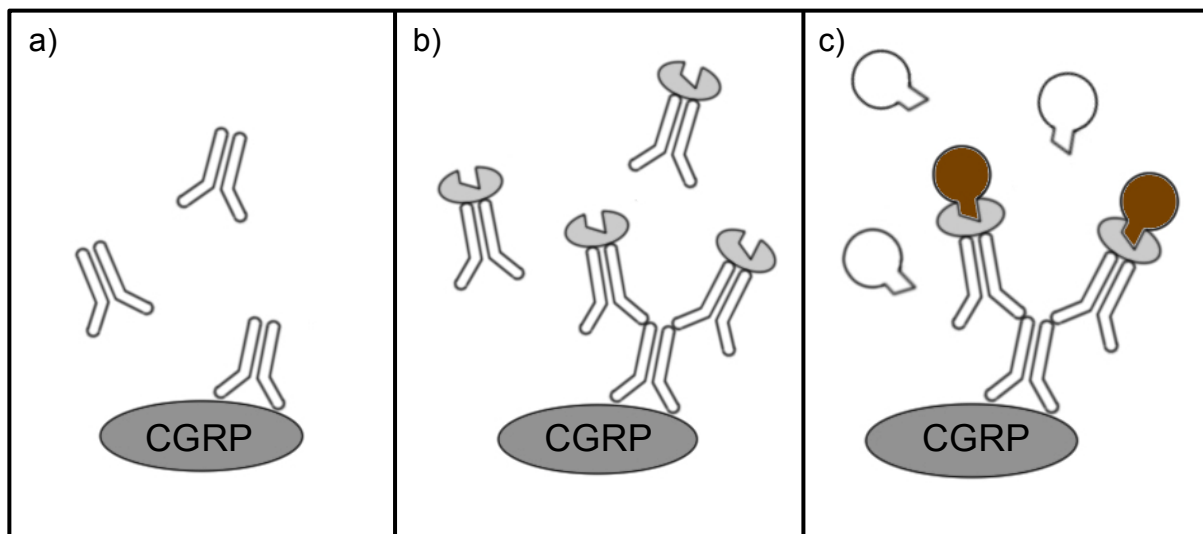
---

Salz	Menge
NaCl	8,18 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,77 g
KCl	0,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g

**Tab. 8** Herstellung des PBS-Puffers auf 1 Liter destilliertes Wasser

### 2.6.3 Färbung mit Anti-CGRP Antikörpern

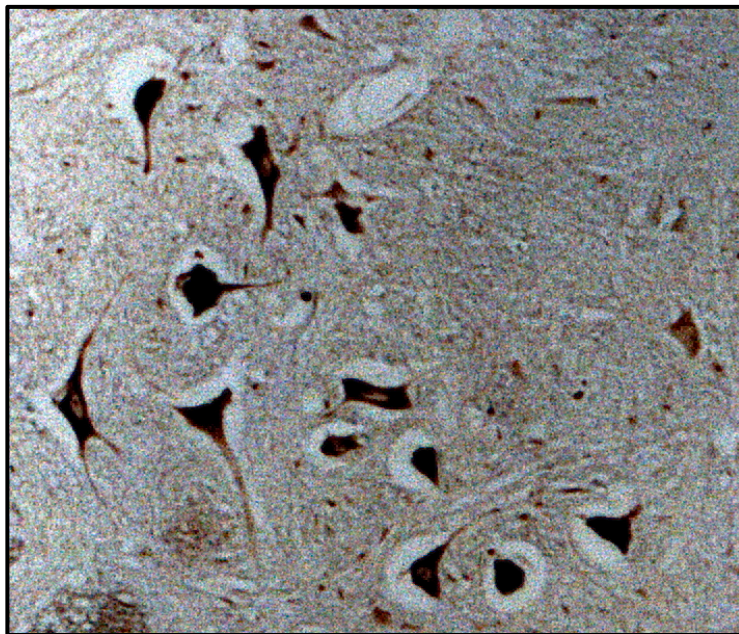
Die Färbung der Schnitte erfolgte mit einem speziellen polyklonalen Antikörper (100µg in 1mg/ml, Fa. Abcam, Cambridge, UK) gegen Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), der aus Kaninchen gewonnen wurde. CGRP befinden sich in hoher Konzentration in Motoneuronen. Mit Hilfe eines Reporterenzym-Färbesystems (ImmPRESS™ Peroxidase Polymer Detection Reagent Kit, Fa. Vector, Burlingame, USA) wurden Enzym-konjugierte Antikörper an den Anti-CGRP Antikörper gebunden. Die Bindung dieser Polymere, die eine sehr hohe Dichte an aktiven Enzymen besitzen (Peroxidasen), an die Anti-CGRP Antikörper erzeugt ein Reagenz, das sterische Interferenz überwindet und die Empfindlichkeit und Signalstärke für den Anti-CGRP Antikörper erhöht. Das Reporterenzym-Färbesystem besteht aus einem Normal Horse Serum 2,5% und einem Universal Anti-Kaninchen Antikörper Reagenz (Enzym-konjugierte Antikörper) zur Bindung an die Anti-CGRP Antikörper. Bei diesem Verfahren wurden die Zellen zunächst mit dem Normal Horse Serum 2,5% blockiert um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Anti-CGRP Antikörper. Nach anschließender Reinigung der Schnitte von ungebundenen Antikörpern wurde der Enzym-konjugierte Universal Anti-Kaninchen Antikörper zugeführt. Dieser band nun an die im Gewebe gebundenen Anti-CGRP Antikörper. Nach erneuter Reinigung wurde Diaminobenzidin (DAB), ein weit verbreitetes Substrat der Peroxidase, hinzugegeben. DAB wurde durch die Peroxidasen, die an den Antikörpern konjugiert sind, oxidiert und bildete ein unlösliches Präzipitat brauner Farbe. Vorhandenes CGRP im Gewebe wurde somit sichtbar und konnte im normalen Licht detektiert werden (Abb. 12).



**Abb. 12** a) Inkubation der Zellen mit Anti-CGRP Antikörpern und Bindung dieser an CGRP b) Zugabe der Enzym-konjugierten Universal Anti-Kaninchen Antikörper und Bindung dieser an die Anti-CGRP Antikörper c) Zugabe von DAB und Bindung dieses an die Peroxidasen, die an die Universal Anti-Kaninchen Antikörper konjugiert sind. Durch Oxidation von DAB durch die Peroxidasen kommt es zu einem braunen Farbumschlag.

Im Anschluss an die Reinigung der Schnitte in PBS-Puffer wurde 1 Tropfen des Normal Horse Serums 2,5% auf jeden der drei Schnitte eines Objektträgers gegeben. Nach 20 min. wurden 100µl des Anti-CGRP Antikörpers in einer Verdünnung von 1:100 (1µl Antikörper : 99µl PBS-Puffer) gleichmäßig (33,3µl pro Schnitt) auf die drei Schnitte eines Objektträgers verteilt. Es folgte die Inkubation der Präparate in einem abgedeckten Gefäß über Nacht bei 6°C im Kühlschrank. Nach 24 Stunden erfolgte eine erneute Reinigung der Schnitte für 3 x 5 min. in PBS-Puffer. Anschließend wurde 1 Tropfen des Universal Anti-Kaninchen Antikörper Reagenz auf jeden der drei Schnitte eines Objektträgers gegeben. Nach 30 min. wurden die Schnitte für 3 x 5 min. in PBS-Puffer gereinigt. In destilliertem Wasser gelöstes DAB wurde mit 1µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% vermischt und 1 Tropfen davon wiederum auf jeden der drei Schnitte eines Objektträgers gegeben. Nach etwa 20 s. kam es zu einer bräunlichen Verfärbung der einzelnen Schnitte, die dann für 5 min. in destilliertes Wasser getaucht wurden. Es folgte eine Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Tab. 3) und anschließend für 2 x 10 min. in Xylol 100%. Danach wurden die Präparate eingedeckt und konnten unter dem Lichtmikroskop (Axio Scope, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) ausgewertet werden.

Durch das verwendete Färbesystem konnten CGRP in Motoneuronen sichtbar gemacht werden. Da die Konzentration von CGRP in diesen sehr hoch ist, wurden sämtliche Motoneurone braun gefärbt, konnten somit eindeutig auffindig gemacht und im Anschluss gezählt werden (Abb. 13). Der in der frühen postpartalen Periode zugeführte Schaden an den Nervenwurzeln C5 und C6 lässt ein konsekutives Absterben der Motoneurone im entsprechenden Segment erwarten.<sup>73</sup> Durch eine Zählung der Motoneurone in den Schnitten des Segments C5 aller Ratten ließ sich ein Unterschied im Überleben der Motoneurone nach einem Nervenschaden feststellen. Dabei wurden die Motoneurone des linken und rechten Vorderhorns eines jeden Tieres gezählt und die Differenz berechnet. Da der rechten Seite kein Nervenschaden zugeführt wurde, konnte diese als gesunder, unbehandelter Vergleich zur linken Seite dienen. Im Anschluss wurde die Summe der Differenzen aller Tiere der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe berechnet und die Ergebnisse beider Gruppen miteinander verglichen. Je höher die Differenz in einer Behandlungsgruppe war, desto größer war die Degeneration und somit ein Verlust der Motoneurone ausgeprägt.



**Abb. 13** Färbung der Motoneurone im Vorderhorn mit Anti-CGRP Antikörpern

## 2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Die zu bestimmenden Daten erfüllen die Voraussetzung einer stetigen Verteilungsfunktion und zweier unabhängigen Zufallsstichproben von Messwerten einer Grundgesamtheit mit gleicher Verteilungsform. Darauf basierend wurden die Daten mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben gegeneinander getestet. Die Auswertung der Daten und die Berechnung der p-Werte erfolgte mit IBM SPSS Statistics (Version 21, IBM, Armonk, USA). Das Signifikanzniveau wurde für  $\alpha=0,05$  festgelegt. Ein Ergebnis bei  $p<0,05$  wird als signifikant bezeichnet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Titerbestimmung und Verifizierung von AdCMV.VEGF<sub>165</sub>

Nach der Amplifikation von AdCMV.VEGF<sub>165</sub> erfolgte zur quantitativen Messung der biologischen Aktivität des Virus eine Titerbestimmung mittels Plaque-Tests. Dieser erbrachte einen Virustiter von  $10^7$  pfU/ml. Bei einer Verdünnung von  $1 \times 10^{-8}$  konnten bei dem eingesetzten Volumen von 20  $\mu$ l x eindeutig voneinander getrennte Plaques gezählt werden.

Der Titer errechnete sich durch folgende Formel:

$$\frac{\# \text{ Plaque}}{d \times V} = \text{pfU} \quad \begin{array}{l} d = \text{Verdünnungsfaktor} \\ V = \text{Volumen des verdünnten Virus in ml pro Petrischale} \end{array}$$

$$\frac{x}{1 \times 10^{-8} \times 0,02 \text{ml}} = 10^7 \text{ pfU/ml}$$

Die Verifizierung von AdCMV.VEGF<sub>165</sub> diente dem Ausschluss einer Wiedergewinnung der Replikationskompetenz des Virus. In seltenen Fällen kann es zu einer Rekombination des replikationsdefizienten Virus mit stabil in der Zelllinie exprimierten Anteilen des Virusgenoms kommen. Dabei kann es zu einer Übertragung der E1A-Region mit Erlangung einer Replikationskompetenz kommen. Mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion und Agarosegel-Elektrophorese konnte der Ausschluss einer Replikationskompetenz sichergestellt werden. Dabei war die Untersuchung des Virusgenoms AdCMV.VEGF<sub>165</sub> auf E1A negativ, so dass dessen Amplifikate nicht nachgewiesen werden konnten. Als Positivkontrolle wurde auf E2A untersucht, dessen Amplifikate erzeugt und in der Agarosegel-Elektrophorese dargestellt werden konnten. Die Ergebnisse schlossen eine Replikationskompetenz des Virus in vivo aus.

## 3.2 Verhaltensuntersuchungen

### 3.2.1 Grid-Walk-Test

Dieser Test wurde ohne postoperatives Training ab der dritten Woche nach der Operation in einem Abstand von zwei Wochen bis zur 13. Woche nach der Operation durchgeführt. Aus einem Versuchszeitraum von 11 Wochen lagen somit sechs Ergebnisse von jedem Tier vor (Tab. 9). Am Ende der Untersuchungen wurde der Mittelwert der Ergebnisse aus den einzelnen Versuchswochen jeweils für die Tiere der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe berechnet und miteinander verglichen. Je höher der Mittelwert war, desto größer war die Anzahl an Fehlritten in den entsprechenden Versuchswochen.

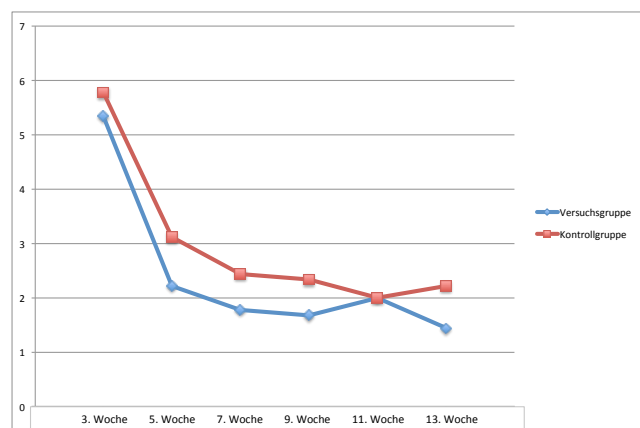
Versuchsgruppe

Tier	3. Woche	5. Woche	7. Woche	9. Woche	11. Woche	13. Woche
1	7	0	0	0	0	0
2	0	9	0	0	0	0
3	4	1	0	0	10	9
4	8	0	7	9	0	0
5	0	1	1	0	6	0
6	13	3	1	4	0	4
7	8	0	1	1	0	0
8	4	1	6	1	2	0
9	4	5	0	0	0	0
Mittelwert	5,33333333	2,22222222	1,77777778	1,66666667	2	1,44444444

Kontrollgruppe

Tier	3. Woche	5. Woche	7. Woche	9. Woche	11. Woche	13. Woche
1	0	0	11	0	9	10
2	17	2	11	0	0	0
3	18	12	0	10	0	0
4	14	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	9	10
6	1	0	0	10	0	0
7	0	13	0	1	0	0
8	1	1	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0	0
Mittelwert	5,77777778	3,11111111	2,44444444	2,33333333	2	2,22222222

**Tab. 9** Anzahl der Fehlritte der Tiere pro Versuchswoche



**Abb. 14** Mittelwert der Fehlritte der Behandlungsgruppen pro Versuchswoche

Über den Versuchszeitraum von 11 Wochen zeigten die Mittelwerte der Fehlritte im Verlauf einen kontinuierlichen Rückgang an Fehlritten in beiden Behandlungsgruppen (Abb. 14). Von Beginn der Untersuchungen bis zum Ende zeigte sich in bis auf einer Versuchswoche eine geringer ausgeprägte Anzahl von Fehlritten in der Versuchsgruppe. In beiden Behandlungsgruppen zeigten sich bei der Mehrzahl der Tiere Schwankungen der Werte im Verlauf der Untersuchungen. Eine chronologische Abnahme an Fehlritten bis zum Versuchsende war nur bei wenigen Tieren festzustellen. In der Gesamtheit der Tiere war diese jedoch erkennbar.

Die Ergebnisse des Grid-Walk-Tests erbrachten im Gruppenvergleich zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe in keiner Versuchswoche einen statistisch signifikanten Unterschied in der Anzahl der Fehlritte.

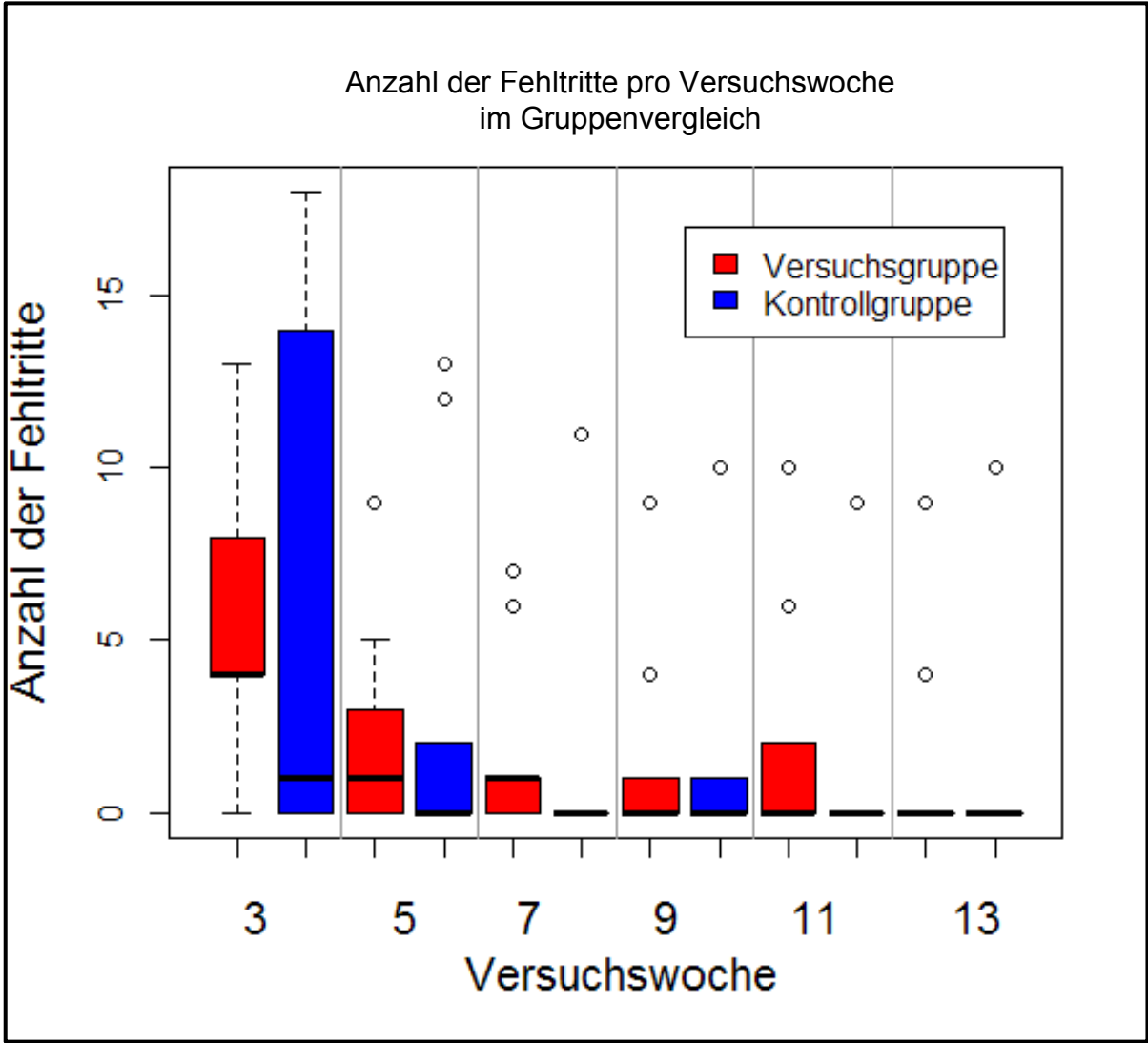


Abb. 15 Anzahl der Fehlritte pro Versuchswoche im Gruppenvergleich

Tier	3. Woche		5. Woche		7. Woche		9. Woche		11. Woche		13. Woche	
	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG
1	7	0	0	0	0	11	0	0	0	9	0	10
2	0	17	9	2	0	11	0	0	0	0	0	0
3	4	18	1	12	0	0	0	10	10	0	9	0
4	8	14	0	0	7	0	9	0	0	0	0	0
5	0	0	1	0	1	0	0	0	6	9	0	10
6	13	1	3	0	1	0	4	10	0	0	4	0
7	8	0	0	13	1	0	1	1	0	0	0	0
8	4	1	1	1	6	0	1	0	2	0	0	0
9	4	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
p-Wert	W = 45, p = 0.7092		W = 45, p = 0.7063		W = 49, p = 0.4109		W = 42, p = 0.943		W = 44, p = 0.8588		W = 38.5, p = 0.7176	

Tab. 10 Anzahl der Fehlritte pro Versuchswoche im Gruppenvergleich



### 3.2.2 Hebe-Test

Dieser Test wurde ohne postoperatives Training ab der dritten Woche nach der Operation in einem Abstand von zwei Wochen bis zur 13. Woche nach der Operation durchgeführt. Aus einem Versuchszeitraum von 11 Wochen lagen somit sechs Ergebnisse pro Seite von jedem Tier vor (Tab. 11). Am Ende der Untersuchungen wurde der Mittelwert der Ergebnisse aus den einzelnen Versuchswochen jeweils für die Tiere der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe berechnet und miteinander verglichen. Je höher der Mittelwert war, desto größer war die maximale Kraft der Greifbewegung in den entsprechenden Versuchswochen.

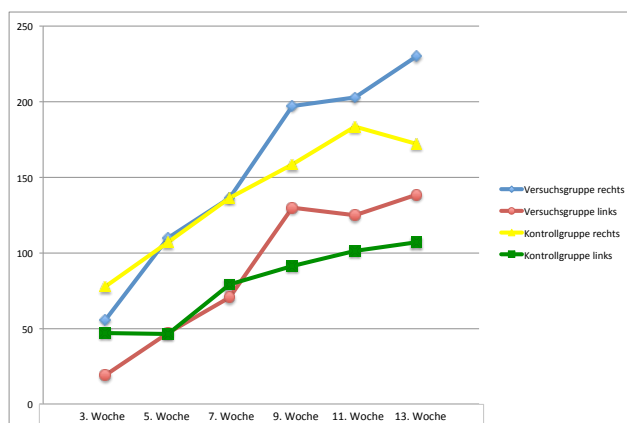
Versuchsgruppe

Tier	3. Woche		5. Woche		7. Woche		9. Woche		11. Woche		13. Woche	
	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links
1	67	35	125	69	143	0	121	0	118	0	225	223
2	64	37	73	0	140	115	147	151	322	261	221	0
3	58	22	115	43	102	82	160	123	198	122	214	116
4	32	0	90	0	120	0	147	0	220	203	266	273
5	38	0	125	55	150	106	330	158	230	219	290	0
6	63	20	113	80	112	77	262	230	233	0	300	243
7	55	0	100	0	154	143	181	151	174	106	98	101
8	57	31	140	128	162	0	230	225	125	88	224	150
9	65	25	105	48	143	110	197	130	203	125	230	138
Mittelwert	55	19	110	47	136	70	197	130	203	125	230	138

Kontrollgruppe

Tier	3. Woche		5. Woche		7. Woche		9. Woche		11. Woche		13. Woche	
	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links
1	72	0	119	0	106	0	192	0	170	0	143	0
2	98	34	76	35	119	0	130	113	133	0	246	177
3	81	0	115	0	140	106	168	0	260	142	166	0
4	87	83	114	81	127	114	128	121	139	124	190	139
5	73	79	122	108	154	0	139	140	114	0	142	0
6	57	55	101	96	125	110	165	0	221	216	140	133
7	73	70	108	0	131	112	135	132	204	127	158	178
8	78	38	105	97	164	132	230	190	168	156	213	195
9	80	65	103	0	160	138	140	127	240	145	153	140
Mittelwert	77,7	47,1	107	46,3	136	79,1	159	91,4	183	101	172	107

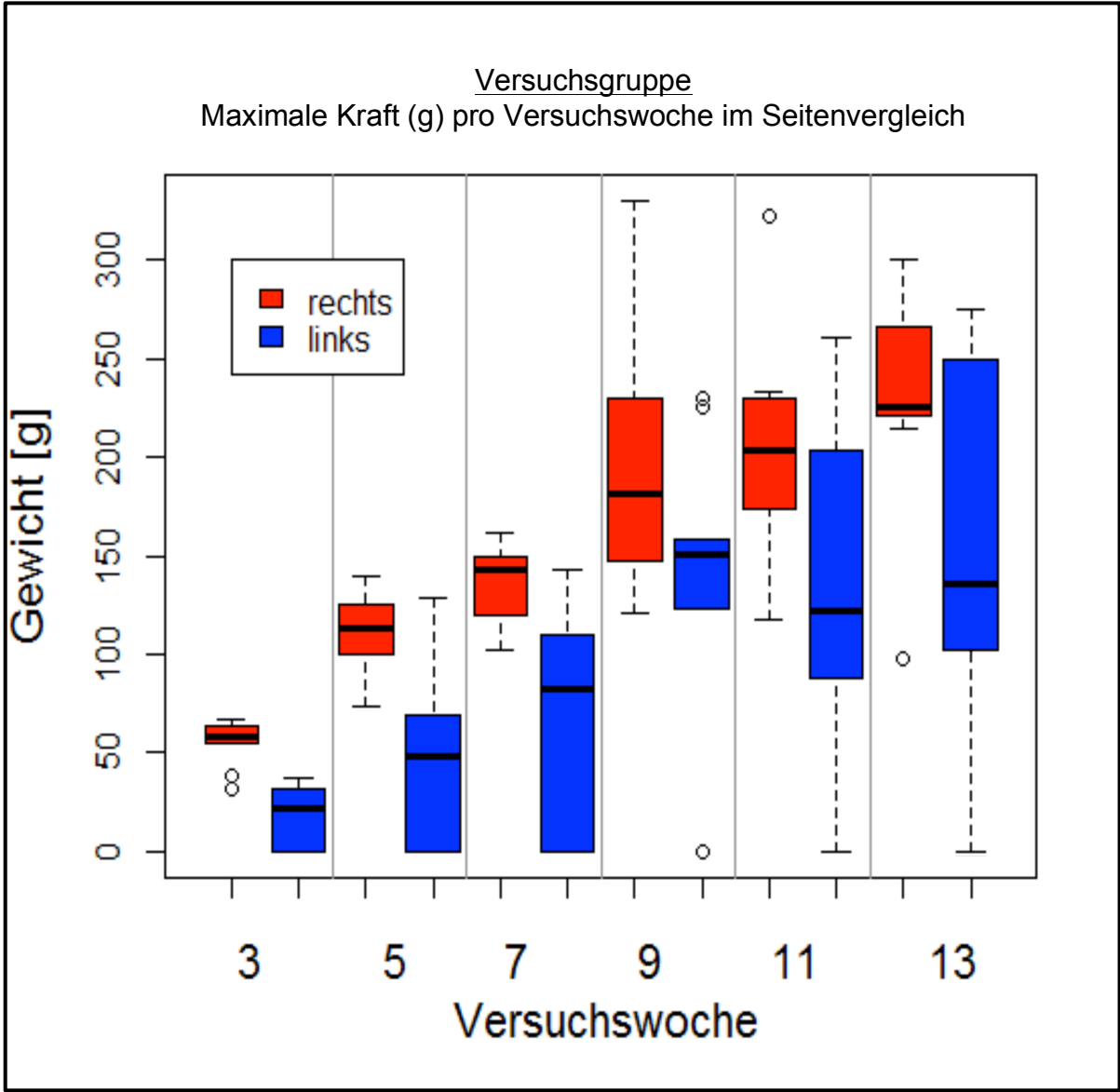
**Tab. 11** Maximale Kraft (g) der Tiere pro Versuchswoche



**Abb. 16** Mittelwert der maximalen Kraft (g) der Behandlungsgruppen pro Versuchswoche

Die Mittelwerte der Messergebnisse zeigten über den Versuchszeitraum von 11 Wochen im Verlauf eine kontinuierliche Zunahme der maximalen Kraft der Greifbewegung in beiden Gruppen (Abb. 16). Eine deutlich stärker ausgeprägte Kraftentwicklung zeigte sich in beiden Gruppen bei der nicht operierten rechten Seite. Die Ergebnisse der operierten linken Seite zeigten im Verlauf eine stärkere Zunahme der Kraftentwicklung in der Versuchsgruppe. Dabei waren zu Beginn der Untersuchungen die Mittelwerte in der Kontrollgruppe teilweise höher als in der Versuchsgruppe. Am Versuchsende sowie im Gesamtverlauf konnte jedoch eine geringer ausgeprägte Kraftentwicklung in der Kontrollgruppe verzeichnet werden.

Die Ergebnisse des Hebe-Tests der Versuchsgruppe erbrachten im Seitenvergleich zwischen der linken und rechten Seite in allen Versuchswochen einen statistisch signifikanten Unterschied in der maximalen Kraft ( $p < 0,05$ ).

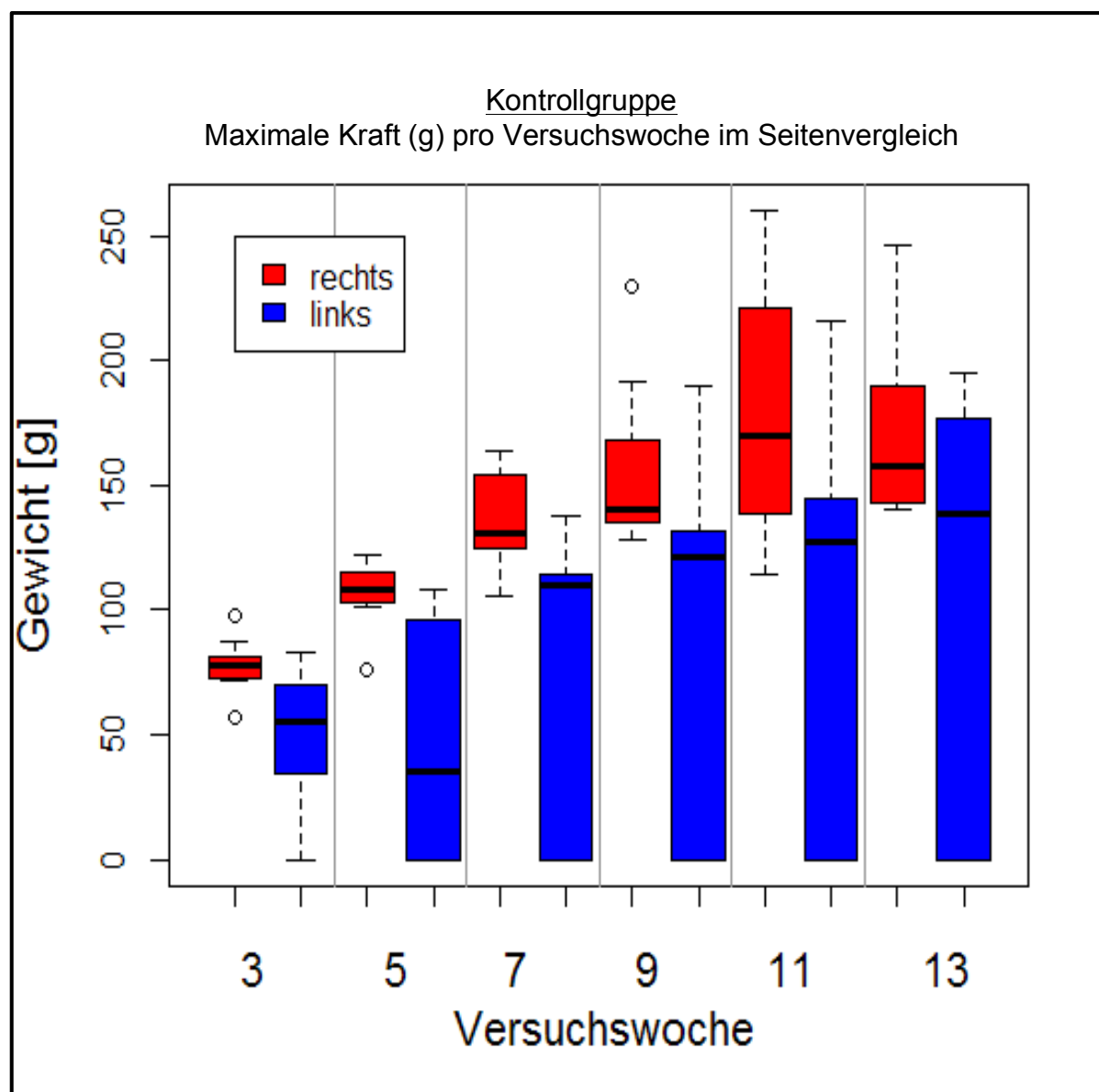


**Abb. 17** Maximale Kraft (g) der Versuchsgruppe pro Versuchswoche im Seitenvergleich

Tier	3. Woche		5. Woche		7. Woche		9. Woche		11. Woche		13. Woche	
	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links
1	67	35	125	69	143	0	121	0	118	0	225	223
2	64	37	73	0	140	115	147	151	322	261	221	0
3	58	22	115	43	102	82	160	123	198	122	214	116
4	32	0	90	0	120	0	147	0	220	203	266	273
5	38	0	125	55	150	106	330	158	230	219	290	0
6	63	20	113	80	112	77	262	230	233	0	300	243
7	55	0	100	0	154	143	181	151	174	106	98	101
8	57	31	140	128	162	0	230	225	125	88	224	150
9	65	25	105	48	143	110	197	130	203	125	230	138
p-Wert	W = 45, p = 0.003906		W = 45, p = 0.003906		W = 45, p = 0.003906		W = 44, p = 0.007812		W = 45, p = 0.003906		W = 41, p = 0.02734	

**Tab. 12** Maximale Kraft (g) der Versuchsgruppe pro Versuchswoche im Seitenvergleich

Auch die Ergebnisse des Hebe-Tests der Kontrollgruppe erbrachten im Seitenvergleich zwischen der linken und rechten Seite in allen Versuchswochen einen statistisch signifikanten Unterschied in der maximalen Kraft ( $p < 0,05$ ).

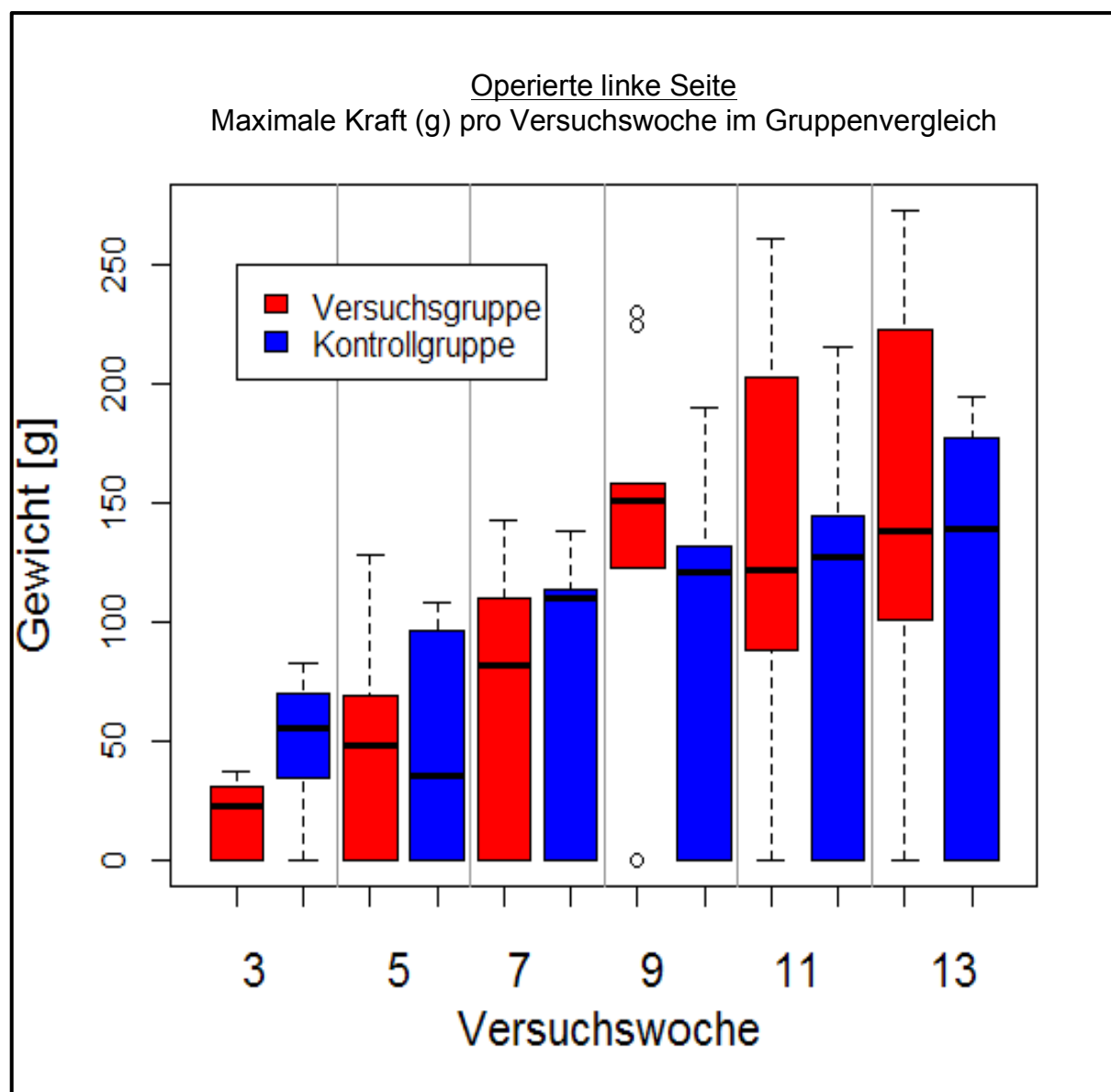


**Abb. 18** Maximale Kraft (g) der Kontrollgruppe pro Versuchswoche im Seitenvergleich

Tier	3. Woche		5. Woche		7. Woche		9. Woche		11. Woche		13. Woche	
	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links
1	72	0	119	0	106	0	192	0	170	0	143	0
2	98	34	76	35	119	0	130	113	133	0	246	177
3	81	0	115	0	140	106	168	0	260	142	166	0
4	87	83	114	81	127	114	128	121	139	124	190	139
5	73	79	122	108	154	0	139	140	114	0	142	0
6	57	55	101	96	125	110	165	0	221	216	140	133
7	73	70	108	0	131	112	135	132	204	127	158	178
8	78	38	105	97	164	132	230	190	168	156	213	195
9	80	65	103	0	160	138	140	127	240	145	153	140
p-Wert	W = 41, p = 0.02734		W = 45, p = 0.003906		W = 45, p = 0.003906		W = 44, p = 0.007812		W = 45, p = 0.003906		W = 41, p = 0.02734	

**Tab. 13** Maximale Kraft (g) der Kontrollgruppe pro Versuchswoche im Seitenvergleich

Der Gruppenvergleich der operierten linken Seite zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe erbrachte nur in der ersten Versuchswoche einen statistisch signifikanten Unterschied in der maximalen Kraft ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 19** Maximale Kraft (g) der operierten linken Seite pro Versuchswoche im Gruppenvergleich

Tier	3. Woche		5. Woche		7. Woche		9. Woche		11. Woche		13. Woche	
	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG
1	35	0	69	0	0	0	0	0	0	0	223	0
2	37	34	0	35	115	0	151	113	261	0	0	177
3	22	0	43	0	82	106	123	0	122	142	116	0
4	0	83	0	81	0	114	0	121	203	124	273	139
5	0	79	55	108	106	0	158	140	219	0	0	0
6	20	55	80	96	77	110	230	0	0	216	243	133
7	0	70	0	0	143	112	151	132	106	127	101	178
8	31	38	128	97	0	132	225	190	88	156	150	195
9	25	65	48	0	110	138	130	127	125	145	138	140
p-Wert	W = 17, p = 0.03809		W = 40, p = 1		W = 34.5, p = 0.612		W = 56, p = 0.1771		W = 42, p = 0.9307		W = 46, p = 0.6624	

**Tab. 14** Maximale Kraft (g) der operierten linken Seite pro Versuchswoche im Gruppenvergleich

### 3.2.3 Grooming-Test

Dieser Test wurde ohne postoperatives Training ab der dritten Woche nach der Operation in einem Abstand von zwei Wochen bis zur 13. Woche nach der Operation durchgeführt. Aus einem Versuchszeitraum von 11 Wochen lagen somit sechs Ergebnisse pro Seite von jedem Tier vor (Tab. 15). Am Ende der Untersuchungen wurde der Mittelwert der Ergebnisse aus den einzelnen Versuchswochen jeweils für die Tiere der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe berechnet und miteinander verglichen. Je niedriger der Mittelwert war, desto größer war die Einschränkung der Abduktion und Ellenbogenflexion in den entsprechenden Versuchswochen.

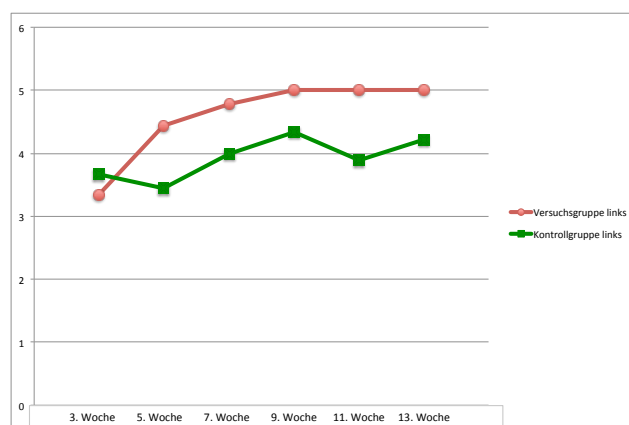
Versuchsgruppe

Tier	3. Woche		5. Woche		7. Woche		9. Woche		11. Woche		13. Woche	
	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links
1	5	4	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5
2	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
3	4	4	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5
4	5	4	5	4	5	4	5	5	5	5	5	5
5	5	4	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5
6	5	2	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5
7	5	2	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5
8	5	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
9	5	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Mittelwert	5	3	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5

Kontrollgruppe

Tier	3. Woche		5. Woche		7. Woche		9. Woche		11. Woche		13. Woche	
	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links
1	5	4	5	4	5	4	5	1	5	4	5	5
2	5	3	5	4	5	1	5	4	5	1	5	4
3	5	3	5	1	5	4	5	4	5	5	5	3
4	5	0	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5
5	5	4	5	4	5	4	5	5	5	5	5	1
6	5	5	5	4	5	4	5	5	5	5	5	5
7	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5
8	5	4	5	5	5	5	5	5	5	0	5	5
9	5	5	5	0	5	5	5	5	5	5	5	5
Mittelwert	5	3,67	5	3,44	5	4	5	4,33	5	3,89	5	4,22

**Tab. 15** Bewegungsausmaß (Grad) der Tiere pro Versuchswoche

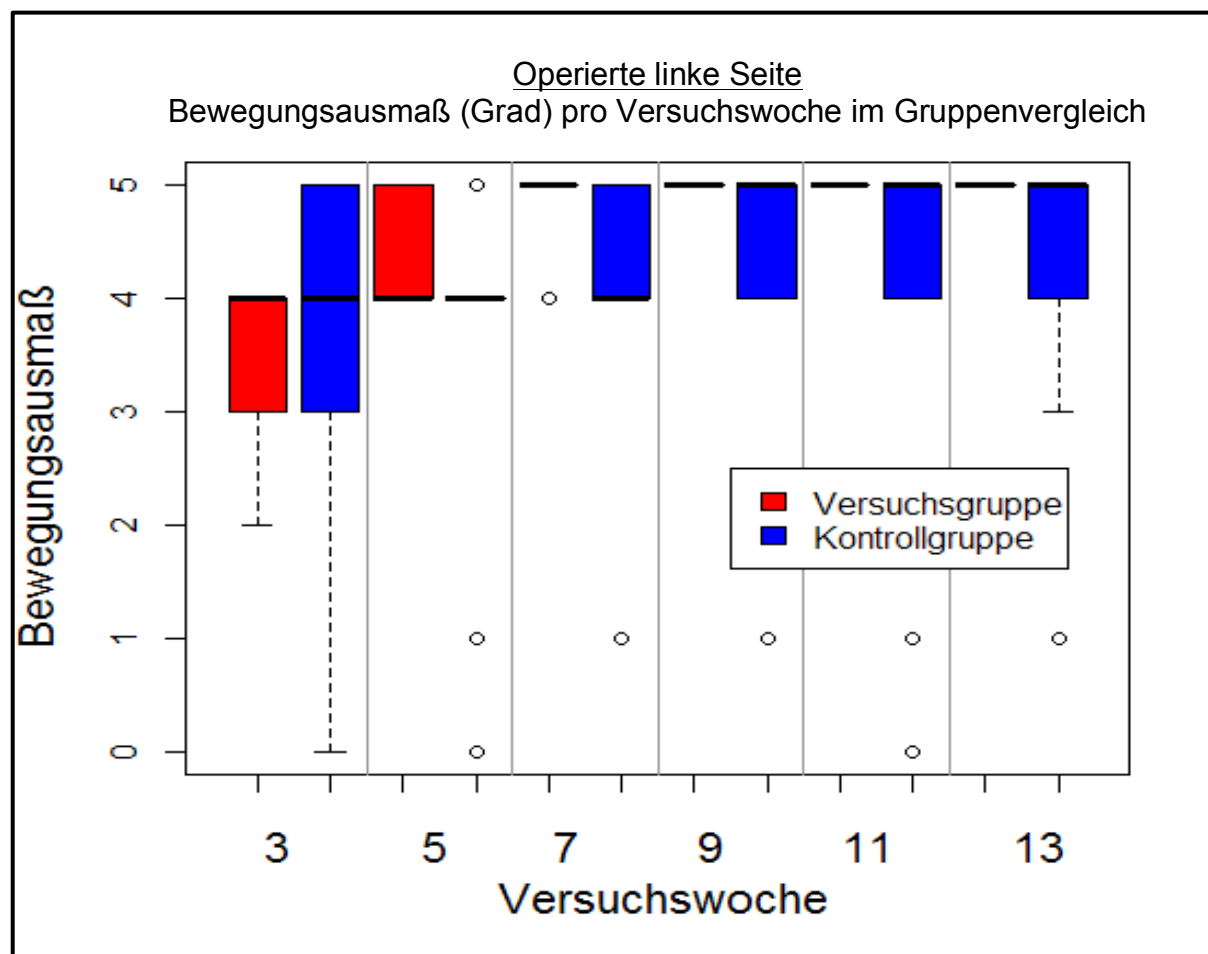


**Abb. 20** Mittelwert des Bewegungsausmaßes (Grad) der Behandlungsgruppen pro Versuchswoche (nur linke Seite dargestellt)

Die Mittelwerte des Bewegungsausmaßes der operierten linken Seite zeigten über den Versuchszeitraum von 11 Wochen eine Zunahme der ausführbaren Abduktion und Ellenbogenflexion in beiden Gruppen (Abb. 20). Im gesamten Verlauf zeigten sich in bis auf der ersten Versuchswoche stärker ausgeprägte Bewegungsmuster auf der operierten linken Seite in der Versuchsgruppe. Ab der 9. Woche war hier bereits das vollständige Ausführen der Bewegung möglich. In der Kontrollgruppe waren im Verlauf Schwankungen festzustellen. Bis zum Versuchsende konnte mit der operierten linken Seite kein vollständiges Bewegungsmuster ausgeführt werden. Im Verlauf zeigte sich aber auch hier eine Verbesserung der motorischen Fähigkeiten.

Die nicht operierte rechte Seite zeigte von Beginn der Untersuchungen bis zum Ende keine Einschränkung in den Bewegungsabläufen in beiden Gruppen.

Der Gruppenvergleich der operierten linken Seite zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe erbrachte in keiner Versuchswoche einen statistisch signifikanten Unterschied in der ausführbaren Abduktion und Ellenbogenflexion.



**Abb. 21** Bewegungsausmaß (Grad) der operierten linken Seite pro Versuchswoche im Gruppenvergleich

Tier	3. Woche		5. Woche		7. Woche		9. Woche		11. Woche		13. Woche	
	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG
1	4	4	5	4	4	4	5	1	5	4	5	5
2	4	3	5	4	5	1	5	4	5	1	5	4
3	4	3	4	1	5	4	5	4	5	5	5	3
4	4	0	4	5	4	4	5	5	5	5	5	5
5	4	4	4	4	5	4	5	5	5	5	5	1
6	2	5	4	4	5	4	5	5	5	5	5	5
7	2	5	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5
8	3	4	5	5	5	5	5	5	5	0	5	5
9	3	5	5	0	5	5	5	5	5	5	5	5
p-Wert	W = 28.5, p = 0.2852		W = 54.5, p = 0.2756		W = 59.5, p = 0.1189		W = 54, p = 0.2059		W = 54, p = 0.2059		W = 54, p = 0.2059	

**Tab. 16** Bewegungsausmaß (Grad) der operierten linken Seite pro Versuchswoche im Gruppenvergleich

### 3.3 Untersuchung des M. deltoideus

#### 3.3.1 Gewichtsbestimmung

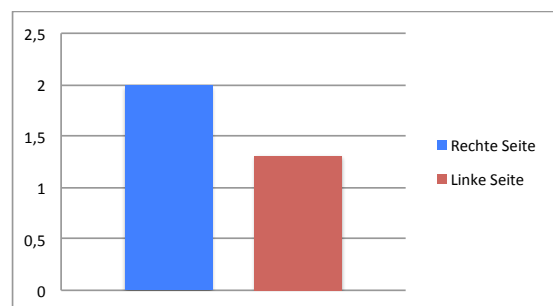
Bei der Gewichtsbestimmung (g) des entnommenen linken und rechten M. deltoideus soll ein Unterschied zwischen beiden Seiten sowie dessen Ausmaß in der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe untersucht werden. Dieses wurde durch den Quotient aus der Summe der Werte der rechten Seite durch die Summe der Werte der linken Seite berechnet. Von jedem Tier wurde außerdem die Differenz zwischen der rechten und der linken Seite berechnet um den Massenunterschied pro Tier zu dokumentieren.

Versuchsgruppe

Tier	Geschlecht	Gewicht (in Gramm)		Differenz
		rechts	links	
1	w	0,1201	0,074	0,0461
2	w	0,1399	0,0651	0,0748
3	m	0,2468	0,2423	0,0045
4	m	0,2905	0,2284	0,0621
5	m	0,3343	0,243	0,0913
6	m	0,4126	0,1829	0,2297
7	w	0,1456	0,0514	0,0942
8	w	0,1627	0,0625	0,1002
9	w	0,1376	0,1592	-0,0216
Summe		1,9901	1,3088	0,6813
Quotient		1,520553178		

**Tab. 17** Gewichtsbestimmung (g) des M. deltoideus im Seitenvergleich

Versuchsgruppe



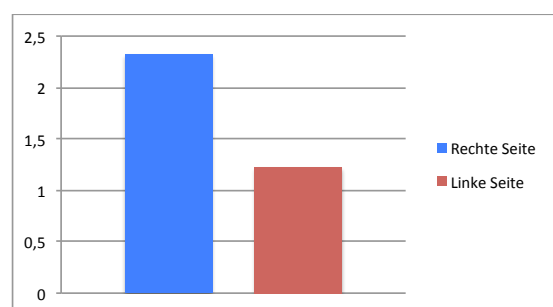
**Abb. 22** Summe der Gewichtsmasse (g) aller Tiere im Seitenvergleich

Kontrollgruppe

Tier	Geschlecht	Gewicht (in Gramm)		Differenz
		rechts	links	
1	w	0,1351	0,0505	0,0846
2	m	0,3426	0,1775	0,1651
3	m	0,2795	0,1051	0,1744
4	m	0,3116	0,1291	0,1825
5	m	0,3066	0,1634	0,1432
6	m	0,246	0,2805	-0,0345
7	m	0,3111	0,1544	0,1567
8	w	0,2173	0,0885	0,1288
9	w	0,1694	0,0748	0,0946
Summe		2,3192	1,2238	1,0954
Quotient		1,895080896		

**Tab. 18** Gewichtsbestimmung (g) des M. deltoideus im Seitenvergleich

Kontrollgruppe



**Abb. 23** Summe der Gewichtsmasse (g) aller Tiere im Seitenvergleich

Die Summen der Ergebnisse zeigten im Seitenvergleich eine deutliche Reduzierung der Muskelmasse der operierten linken Seite in beiden Gruppen. Bei jeweils einem Tier pro Gruppe war der linke M. deltoideus schwerer als der Rechte. In diesen Fällen gab es eine negative Differenz zwischen der rechten und der linken Seite. Das Ausmaß des Unterschieds der Muskelmasse zwischen der rechten und der linken Seite wurde in beiden Gruppen durch den Quotient dargestellt. Dabei zeigte sich in der Kontrollgruppe eine Reduzierung des Muskelgewichts der linken Seite im Vergleich zur rechten Seite um 47,23% (Tab. 19). Der Quotient in der Versuchsgruppe wies auf eine Reduzierung des Muskelgewichts der linken Seite im Vergleich zur rechten Seite um 34,23% hin. Basierend auf den Ergebnissen der Gewichtsbestimmung konnte eine um 27,52% stärker ausgeprägte Gewichtsreduzierung der operierten linken Seite in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Versuchsgruppe festgestellt werden (Tab. 20).

Versuchsgruppe

Rechts	1
Links	1,52055318
Abweichung	34,23%

Kontrollgruppe

Rechts	1
Links	1,8950809
Abweichung	47,23%

**Tab. 19** Abweichung (%) der Muskelmasse der Behandlungsgruppen im Seitenvergleich

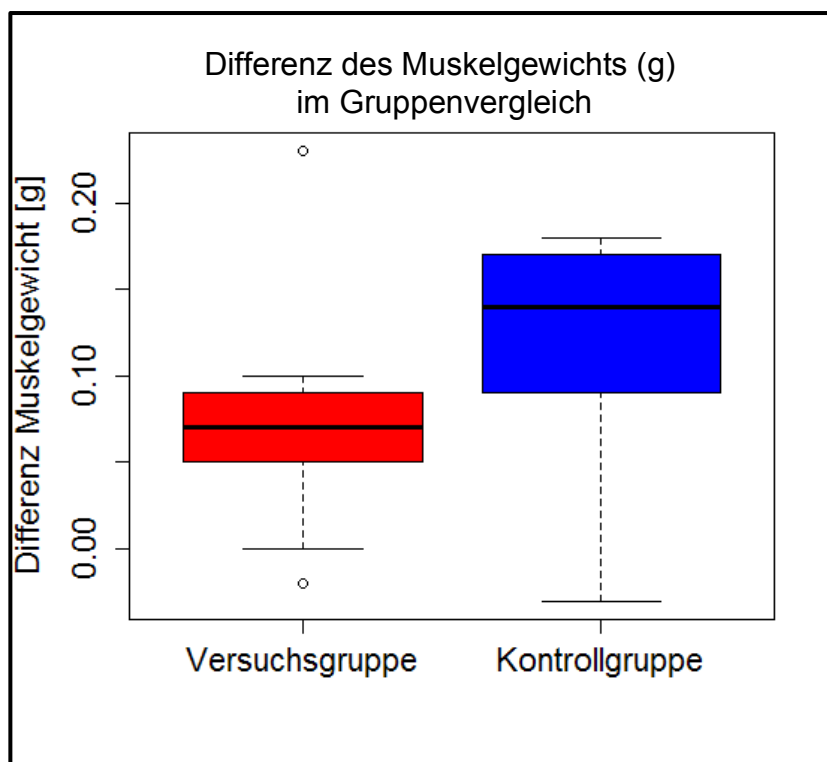
Gruppenvergleich

Versuchsgruppe	34,23%
Kontrollgruppe	47,23%
Abweichung	27,52%

**Tab. 20** Abweichung (%) der Muskelmasse im Gruppenvergleich



Im statistischen Gruppenvergleich wurden die Differenzen der einzelnen Tiere bis zur zweiten Stelle nach dem Komma aufgerundet und die Werte gegeneinander verglichen. Die Ergebnisse zeigten zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe keinen statistisch signifikanten Unterschied in den Differenzen des Muskelgewichts.



Tier	VG	KG
1	0,05	0,08
2	0,07	0,17
3	0,00	0,17
4	0,06	0,18
5	0,09	0,14
6	0,23	-0,03
7	0,09	0,16
8	0,10	0,13
9	-0,02	0,09
p-Wert	W = 22, p = 0.1079	

**Tab. 21** Differenzen des Muskelgewichts (g) im Gruppenvergleich

**Abb. 24** Differenzen des Muskelgewichts (g) im Gruppenvergleich

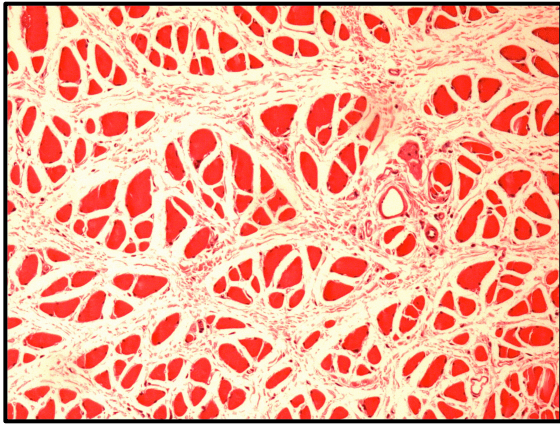
### 3.3.2 Histologische Untersuchung

Die histologische Untersuchung des M. deltoideus erfolgte nach festgelegten Kriterien, die eine Beurteilung der Muskelfaserdichte, der Homogenität der Muskelfasergröße, der Mikrofaszikelbildung, der perimysialen Fibrose, der Fettgewebsbildung sowie den Entzündungsreaktionen in verschiedene Grade ermöglichen (Tab. 22).

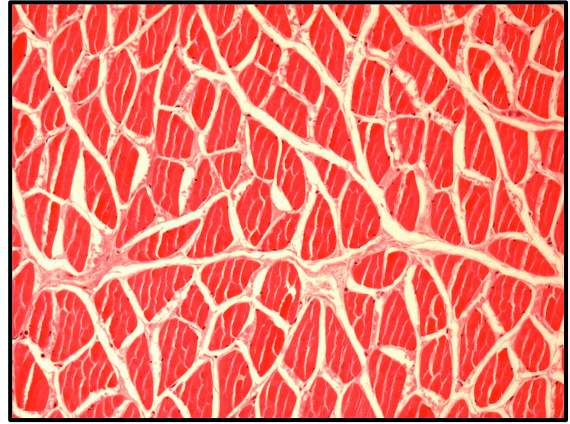
Die Kriterien Muskelfaserdichte (Abb. 25 und 26) und Homogenität der Muskelfasergröße erlauben eine Beurteilung über das Ausmaß der Atrophie des Muskels. Die Mikrofaszikelbildung (Abb. 27) stellt ein inkomplettes Reinnervationsmuster dar. Bei unkontrolliertem Wachstum der Nerven in den Muskel und das umliegende Gewebe kann es zur Innervation einzelner Faszikel kommen, die außerhalb des Hauptfaserverlaufs eine eigenständige Einheit bilden. Die perimysiale Fibrose (Abb. 28) als Zeichen einer vermehrten Bindegewebsbildung kann bei Entzündungen, mangelnder Durchblutung oder Untergang des Muskelgewebes entstehen. Diese Gründe führen auch zu einer übermäßigen Fettgewebsbildung (Abb. 29). Entzündungsreaktionen (Abb. 30) deuten auf unterschiedliche pathologische Prozesse hin. Die Untersuchungen am Mikroskop (Axio Scope, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) erfolgten bei 10-facher Vergrößerung (Plan-Neofluar<sup>®</sup>, Ph1, 10x / 0,3, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen).

Die Auswirkungen des erzeugten Nervenschadens sowie der Verlauf der anschließenden Regeneration ließen sich durch diese Kriterien bestmöglich in den Muskelpräparaten bestimmen. Alle Kriterien wurden je nach Art der Ausprägung in verschiedene Grade (0-3) eingeteilt (Tab. 22). Die Kriterien Mikrofaszikelbildung, perimysiale Fibrose, Fettgewebsbildung sowie Entzündungsreaktionen wurden zusätzlich in fokal (1), multifokal (2) oder diffus (3) auftretend eingeteilt. Dieser Wert wurde mit dem entsprechenden Grad (0-3) multipliziert. Anschließend wurden alle Werte eines Schnitts addiert. Je höher dieses Ergebnis ausfiel, desto stärker war die Degeneration des Muskels ausgeprägt. Folglich bedeutet dies eine geringer stattgefundene Regeneration der peripheren Nerven.

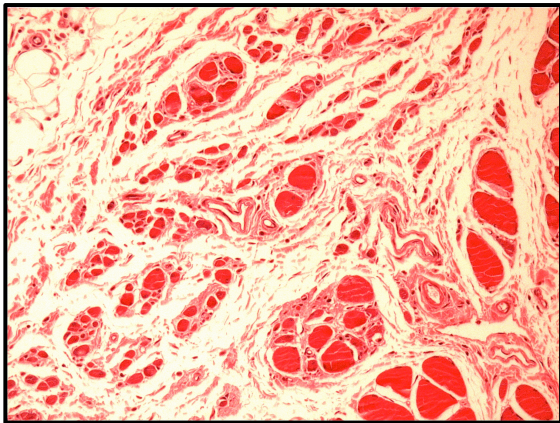
Bilder aus den histologischen Untersuchungen des M. deltoideus (HE-Färbung):



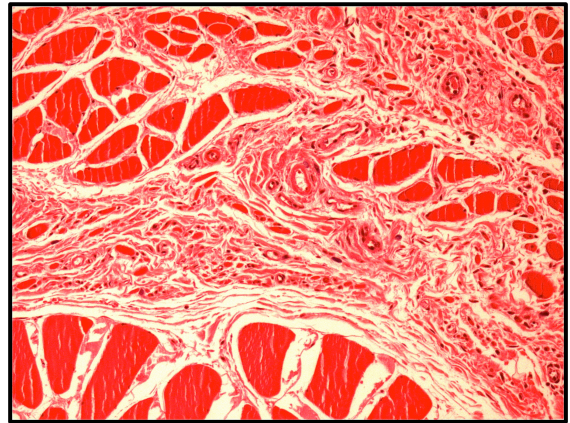
**Abb. 25** Reduzierte Muskelfaserdichte



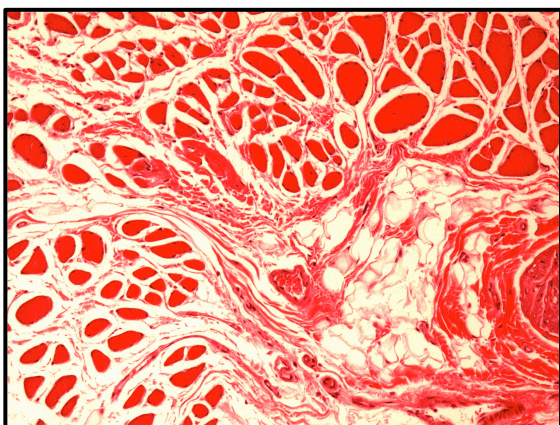
**Abb. 26** Ausgeprägte Muskelfaserdichte



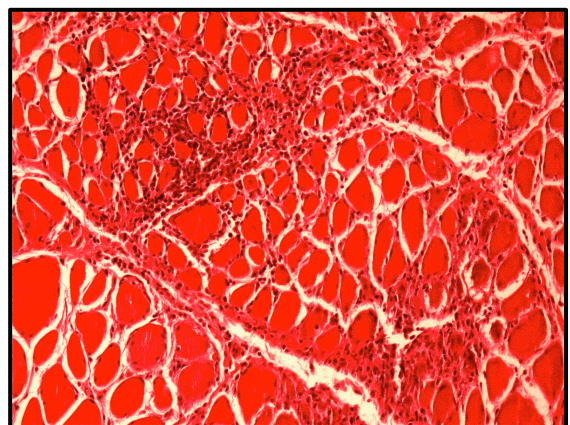
**Abb. 27** Mikrofaszikelbildung



**Abb. 28** Ausgeprägte perimysiale Fibrose



**Abb. 29** Fettgewebsbildung



**Abb. 30** Entzündungsreaktion

## M. deltoideus der rechten Seite:

	Muskelfaserdichte	Homogenität Fasergröße	Mikrofaszikelbildung	Fibrose	Fettgewebsbildung	Entzündungsreaktion
<b>Grad 0</b>	stark	stark	keine	keine	keine	keine
<b>Grad 1</b>	deutlich	deutlich	gering	gering	gering	gering
<b>Grad 2</b>	gering	gering	deutlich	deutlich	deutlich	deutlich
<b>Grad 3</b>	kaum	kaum	stark	stark	stark	stark

**Tab. 22** Ausprägung der Kriterien in Grade

Versuchsgruppe

Tier	Muskelfaserdichte	Homogenität Fasergröße	Mikrofaszikelbildung		Fibrose		Fettgewebsbildung		Entzündungsreaktion	
	Grad	Grad	Grad	Auftreten	Grad	Auftreten	Grad	Auftreten	Grad	Auftreten
1	1	1	0	0	1	3	0	0	0	0
2	0	0	0	0	2	2	0	0	1	1
3	1	1	0	0	2	2	0	0	1	1
4	0	0	0	0	2	2	0	0	2	1
5	1	1	0	0	2	3	1	1	0	0
6	1	1	0	0	1	3	0	0	1	1
7	1	1	0	0	2	2	1	1	1	1
8	1	1	0	0	1	3	0	0	0	0
9	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1

Kontrollgruppe

Tier	Muskelfaserdichte	Homogenität Fasergröße	Mikrofaszikelbildung		Fibrose		Fettgewebsbildung		Entzündungsreaktion	
	Grad	Grad	Grad	Auftreten	Grad	Auftreten	Grad	Auftreten	Grad	Auftreten
1	1	0	0	0	1	3	1	1	0	0
2	1	0	0	0	1	2	1	1	0	0
3	1	1	0	0	2	3	0	0	1	1
4	1	1	0	0	2	2	1	1	1	1
5	1	0	0	0	2	2	0	0	2	1
6	1	1	0	0	2	2	0	0	1	1
7	1	1	0	0	1	2	0	0	2	1
8	1	1	0	0	1	2	0	0	1	1
9	1	1	0	0	1	2	0	0	1	1

**Tab. 23** Histologische Beurteilung des M. deltoideus der rechten Seite in Grade

Versuchsgruppe

Tier	Muskelfaserdichte	Homogenität Fasergröße	Mikrofaszikelbildung	Fibrose	Fettgewebsbildung	Entzündungsreaktion	Ergebnis
1	1	1	0	3	0	0	5
2	0	0	0	4	0	1	5
3	1	1	0	4	0	1	7
4	0	0	0	4	0	2	6
5	1	1	0	6	1	0	9
6	1	1	0	3	0	1	6
7	1	1	0	4	1	1	8
8	1	1	0	3	0	0	5
9	0	1	0	1	0	1	3
Summe							54

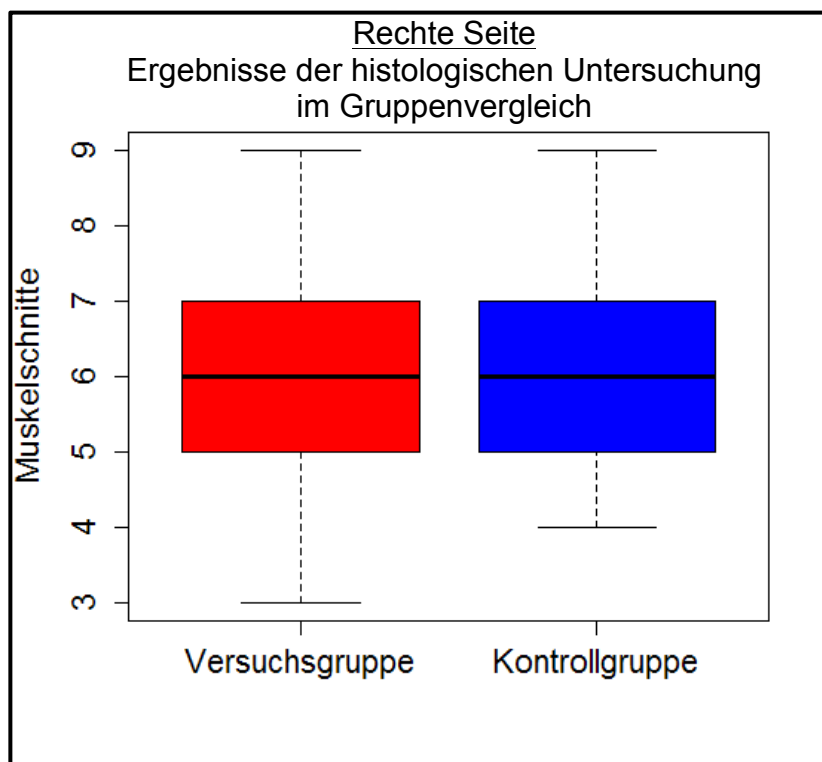
Kontrollgruppe

Tier	Muskelfaserdichte	Homogenität Fasergröße	Mikrofaszikelbildung	Fibrose	Fettgewebsbildung	Entzündungsreaktion	Ergebnis
1	1	0	0	3	1	0	5
2	1	0	0	2	1	0	4
3	1	1	0	6	0	1	9
4	1	1	0	4	1	1	8
5	1	0	0	4	0	2	7
6	1	1	0	4	0	1	7
7	1	1	0	2	0	2	6
8	1	1	0	2	0	1	5
9	1	1	0	2	0	1	5
Summe							56

**Tab. 24** Ergebnisse der histologischen Untersuchung des M. deltoideus der rechten Seite

Die histologischen Ergebnisse des M. deltoideus der nicht operierten rechten Seite zeigten in der Versuchsgruppe und in der Kontrollgruppe ähnliche Werte (Tab. 24). Insgesamt zeigte sich eine geringe Ausprägung aller Kriterien. Eine Mikrofaszikelbildung wurde in keiner der beiden Gruppen vorgefunden.

Im Gruppenvergleich zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe zeigten die Ergebnisse der histologischen Untersuchung des M. deltoideus der rechten Seite keinen statistisch signifikanten Unterschied.



Tier	VG	KG
1	5	5
2	5	4
3	7	9
4	6	8
5	9	7
6	6	7
7	8	6
8	5	5
9	3	5
p-Wert	W = 38.5, p = 0.895	

**Tab. 25** Ergebnisse der histologischen Untersuchung der rechten Seite im Gruppenvergleich

**Abb. 31** Ergebnisse der histologischen Untersuchung der rechten Seite im Gruppenvergleich

### M. deltoideus der linken Seite:

	Muskelfaserdichte	Homogenität Fasergröße	Mikrofaszikelbildung	Fibrose	Fettgewebsbildung	Entzündungsreaktion
<b>Grad 0</b>	stark	stark	keine	keine	keine	keine
<b>Grad 1</b>	deutlich	deutlich	gering	gering	gering	gering
<b>Grad 2</b>	gering	gering	deutlich	deutlich	deutlich	deutlich
<b>Grad 3</b>	kaum	kaum	stark	stark	stark	stark

**Tab. 26** Ausprägung der Kriterien in Grade

Versuchsgruppe

Tier	Muskelfaserdichte	Homogenität Fasergröße	Mikrofaszikelbildung		Fibrose		Fettgewebsbildung		Entzündungsreaktion	
	Grad	Grad	Grad	Auftreten	Grad	Auftreten	Grad	Auftreten	Grad	Auftreten
1	1	2	2	2	2	2	0	0	1	2
2	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
3	0	1	0	0	2	2	0	0	0	0
4	1	1	1	1	2	2	0	0	0	0
5	2	2	2	2	2	3	1	1	0	0
6	1	2	2	2	2	3	1	2	1	2
7	2	2	2	2	3	3	1	1	2	2
8	1	1	0	0	2	3	1	1	1	1
9	1	2	1	2	2	2	1	2	1	1

Kontrollgruppe

Tier	Muskelfaserdichte	Homogenität Fasergröße	Mikrofaszikelbildung		Fibrose		Fettgewebsbildung		Entzündungsreaktion	
	Grad	Grad	Grad	Auftreten	Grad	Auftreten	Grad	Auftreten	Grad	Auftreten
1	2	2	2	2	3	3	1	2	0	0
2	1	2	1	1	1	3	2	1	3	2
3	2	1	1	1	2	3	2	2	1	1
4	1	1	1	1	2	2	1	1	1	2
5	1	1	0	0	2	3	0	0	1	2
6	2	2	1	1	3	3	2	1	1	2
7	2	2	1	2	3	3	0	0	2	1
8	1	1	0	0	2	3	1	1	1	1
9	2	2	2	2	2	3	1	1	2	1

**Tab. 27** Histologische Beurteilung des M. deltoideus der linken Seite in Grade

Versuchsgruppe

Tier	Muskelfaserdichte	Homogenität Fasergröße	Mikrofaszikelbildung	Fibrose	Fettgewebsbildung	Entzündungsreaktion	Ergebnis
1	1	2	4	4	0	2	13
2	0	1	0	1	0	0	2
3	0	1	0	4	0	0	5
4	1	1	1	4	0	0	7
5	2	2	4	6	1	0	15
6	1	2	4	6	2	2	17
7	2	2	4	9	1	4	22
8	1	1	0	6	1	1	10
9	1	2	2	4	2	1	12
Summe							103

Kontrollgruppe

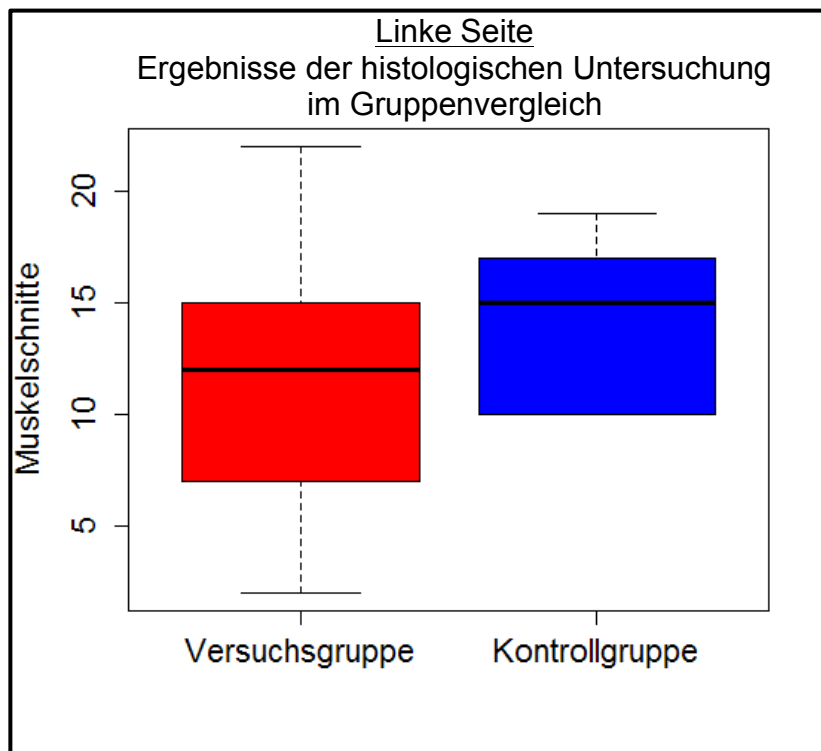
Tier	Muskelfaserdichte	Homogenität Fasergröße	Mikrofaszikelbildung	Fibrose	Fettgewebsbildung	Entzündungsreaktion	Ergebnis
1	2	2	4	9	2	0	19
2	1	2	1	3	2	6	15
3	2	1	1	6	4	1	15
4	1	1	1	4	1	2	10
5	1	1	0	6	0	2	10
6	2	2	1	9	2	2	18
7	2	2	2	9	0	2	17
8	1	1	0	6	1	1	10
9	2	2	4	6	1	2	17
Summe							131

**Tab. 28** Ergebnisse der histologischen Untersuchung des M. deltoideus der linken Seite

Die histologischen Ergebnisse des M. deltoideus der operierten linken Seite zeigten im Vergleich zur nicht operierten rechten Seite deutlich höhere Werte (Tab. 28).

Außerdem ließen sich zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe größere Unterschiede in den Ergebnissen feststellen. In der Summe zeigte sich eine stärkere Ausprägung aller Kriterien in der Kontrollgruppe.

Im Gruppenvergleich zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe zeigten die Ergebnisse der histologischen Untersuchung des M. deltoideus der linken Seite ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied.



Tier	VG	KG
1	13	19
2	2	15
3	5	15
4	7	10
5	15	10
6	17	18
7	22	17
8	10	10
9	12	17
p-Wert	W = 26.5, p = 0.2266	

**Tab. 29** Ergebnisse der histologischen Untersuchung der linken Seite im Gruppenvergleich

**Abb. 32** Ergebnisse der histologischen Untersuchung der linken Seite im Gruppenvergleich



### 3.4 Untersuchung des Plexus brachialis

#### 3.4.1 Histologische Untersuchung

Die histologische Untersuchung des Plexus brachialis erfolgte ebenfalls nach festgelegten Kriterien, die eine Beurteilung der Nervenfaserdichte, der Homogenität der Nervenfasergroße, der Gefäßdichte, der erkennbaren Faserdegeneration durch Auftreten von Vakuolen, der epineuralen Fibrose sowie den Entzündungsreaktionen in verschiedene Grade ermöglichen (Tab. 30).

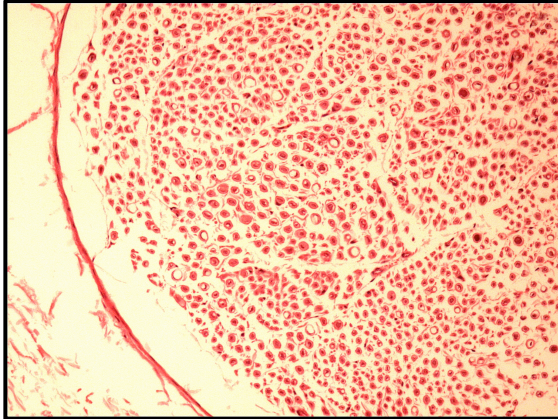
Die Kriterien Nervenfaserdichte (Abb. 33 und 34) und Homogenität der Nervenfasergroße erlauben eine Beurteilung über das Ausmaß der Atrophie der einzelnen Nerven des Plexus brachialis. Die Ausprägung der Gefäßdichte (Abb. 35) hat eine entscheidende Bedeutung für das Nervengewebe. Eine zu gering ausgeprägte Gefäßdichte kann die Ursache einer Atrophie sowie des Untergangs von Nervenzellen sein. Das Auftreten von Vakuolen (Abb. 36) zwischen den Nervenfasern ist ein Zeichen für eine stattfindende Faserdegeneration. Hierbei ist es bereits zum Untergang von Nervenzellen gekommen. Die epineurale Fibrose (Abb. 37) deutet auf eine vermehrte Bindegewebsbildung hin, die auch hier durch Entzündungen, mangelnde Durchblutung oder Untergang des Nervengewebes entstanden sein kann. Entzündungsreaktionen (Abb. 38) können unterschiedlichen pathologischen Prozessen zu Grunde liegen. Die Untersuchungen am Mikroskop (Axio Scope, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) erfolgten bei 10-facher Vergrößerung (Plan-Neofluar<sup>®</sup>, Ph1, 10x / 0,3, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen).

Die Auswirkungen des erzeugten Nervenschadens sowie der Verlauf der anschließenden Regeneration ließen sich durch die genannten Kriterien bestmöglich unmittelbar in den Plexuspräparaten selbst bestimmen. Alle Kriterien wurden je nach Art der Ausprägung in verschiedene Grade (0-3) eingeteilt (Tab. 30). Die Kriterien Faserdegeneration durch Auftreten von Vakuolen, epineurale Fibrose sowie Entzündungsreaktionen wurden zusätzlich in fokal (1), multifokal (2) oder diffus (3) auftretend eingeteilt. Dieser Wert wurde mit dem entsprechenden Grad (0-3) multipliziert. Anschließend wurden alle Werte eines Schnitts addiert. Je höher dieses

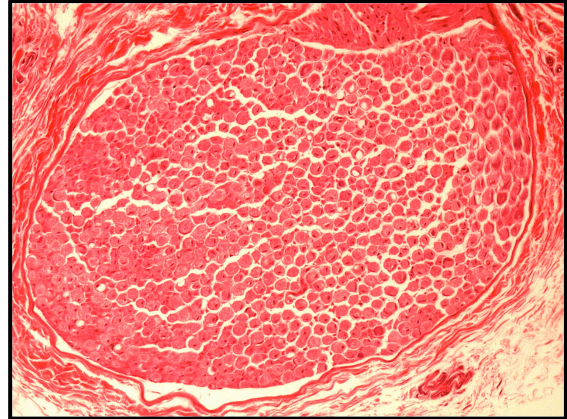


Ergebnis ausfiel, desto stärker war die Degeneration der einzelnen Nerven des Plexus brachialis ausgeprägt.

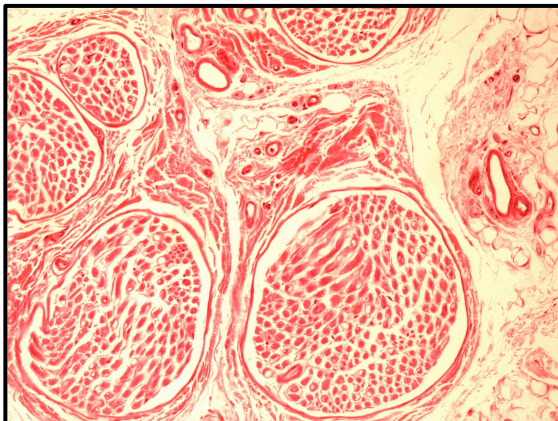
Bilder aus den histologischen Untersuchungen des Plexus brachialis (HE-Färbung):



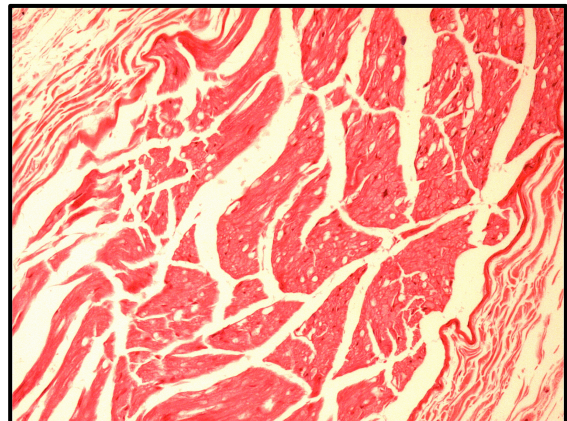
**Abb. 33** Reduzierte Nervenfaserdichte



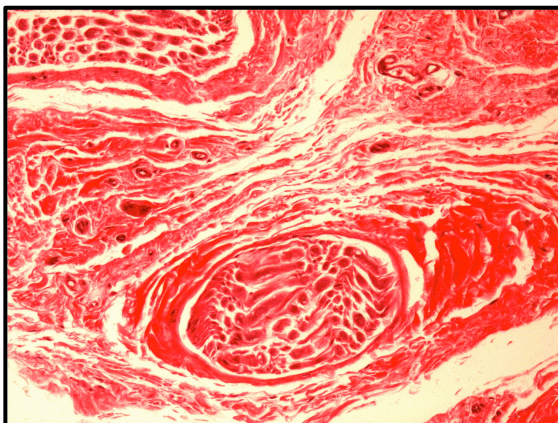
**Abb. 34** Ausgeprägte Nervenfaserdichte



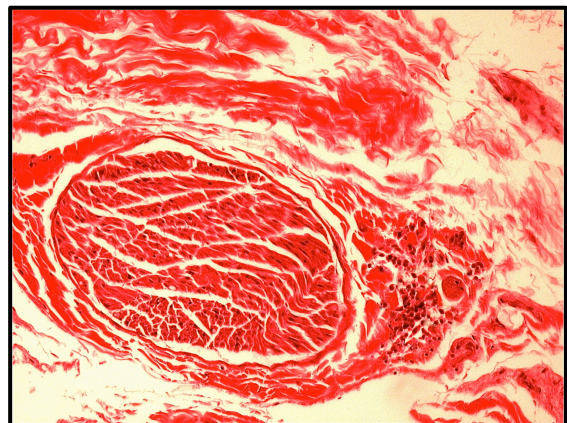
**Abb. 35** Ausgeprägte Gefäßdichte



**Abb. 36** Auftreten von Vakuolen



**Abb. 37** Ausgeprägte epineurale Fibrose



**Abb. 38** Entzündungsreaktion

## Plexus brachialis der rechten Seite:

	Nervenfaserdichte	Homogenität Fasergröße	Gefäßdichte	Auftreten von Vakuolen	Fibrose	Entzündungsreaktion
<b>Grad 0</b>	stark	stark	stark	keine	keine	keine
<b>Grad 1</b>	deutlich	deutlich	deutlich	gering	gering	gering
<b>Grad 2</b>	gering	gering	gering	deutlich	deutlich	deutlich
<b>Grad 3</b>	kaum	kaum	kaum	stark	stark	stark

**Tab. 30** Ausprägung der Kriterien in Grade

Versuchsgruppe

Tier	Nervenfaserdichte	Homogenität Fasergröße	Gefäßdichte	Auftreten von Vakuolen		Fibrose		Entzündungsreaktion	
	Grad	Grad	Grad	Grad	Auftreten	Grad	Auftreten	Grad	Auftreten
1	0	0	1	1	1	0	0	0	0
2	1	1	1	1	1	0	0	0	0
3	1	1	0	1	2	0	0	0	0
4	1	1	1	0	0	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0	1	1	0	0
6	0	0	0	1	1	0	0	0	0
7	1	1	1	1	1	0	0	0	0
8	0	1	1	0	0	0	0	0	0
9	1	1	1	1	1	0	0	0	0

Kontrollgruppe

Tier	Nervenfaserdichte	Homogenität Fasergröße	Gefäßdichte	Auftreten von Vakuolen		Fibrose		Entzündungsreaktion	
	Grad	Grad	Grad	Grad	Auftreten	Grad	Auftreten	Grad	Auftreten
1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
2	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3	1	1	0	1	1	1	1	0	0
4	1	1	1	1	1	0	0	0	0
5	1	1	1	1	1	1	1	0	0
6	1	1	0	1	1	0	0	0	0
7	0	0	1	1	1	0	0	0	0
8	0	1	1	1	1	0	0	0	0
9	1	0	1	0	0	0	0	0	0

**Tab. 31** Histologische Beurteilung des Plexus brachialis der rechten Seite in Grade

Versuchsgruppe

Tier	Nervenfaserdichte	Homogenität Fasergröße	Gefäßdichte	Auftreten von Vakuolen	Fibrose	Entzündungsreaktion	Ergebnis
1	0	0	1	1	0	0	2
2	1	1	1	1	0	0	4
3	1	1	0	2	0	0	4
4	1	1	1	0	0	0	3
5	1	0	0	0	1	0	2
6	0	0	0	1	0	0	1
7	1	1	1	1	0	0	4
8	0	1	1	0	0	0	2
9	1	1	1	1	0	0	4
Summe							26

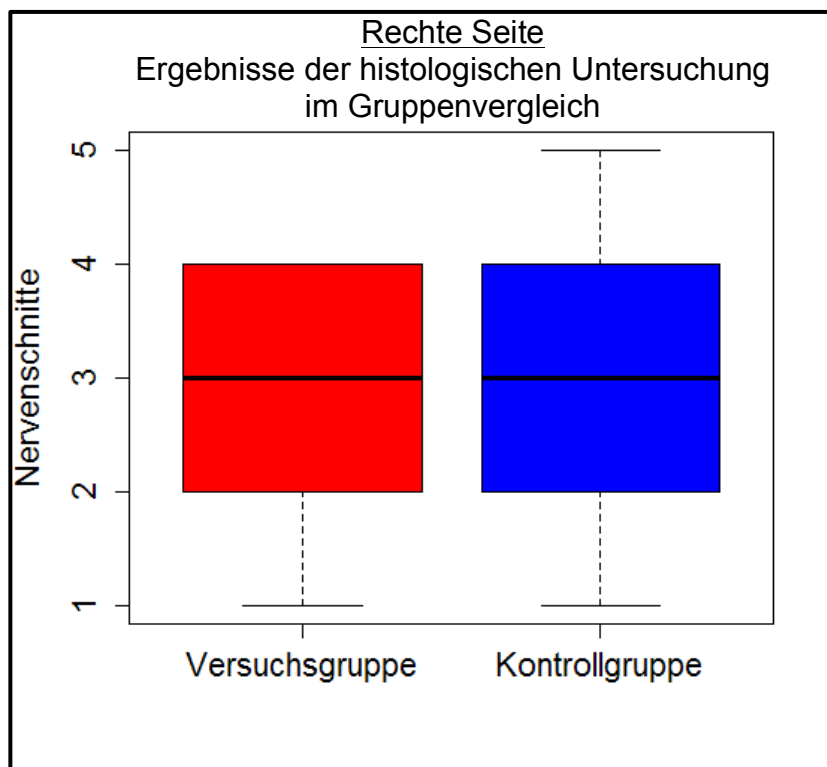
Kontrollgruppe

Tier	Nervenfaserdichte	Homogenität Fasergröße	Gefäßdichte	Auftreten von Vakuolen	Fibrose	Entzündungsreaktion	Ergebnis
1	0	0	0	0	1	0	1
2	0	1	0	0	0	0	1
3	1	1	0	1	1	0	4
4	1	1	1	1	0	0	4
5	1	1	1	1	1	0	5
6	1	1	0	1	0	0	3
7	0	0	1	1	0	0	2
8	0	1	1	1	0	0	3
9	1	0	1	0	0	0	2
Summe							25

**Tab. 32** Ergebnisse der histologischen Untersuchung des Plexus brachialis der rechten Seite

Die histologischen Ergebnisse des Plexus brachialis der nicht operierten rechten Seite zeigten in der Versuchsgruppe und in der Kontrollgruppe ähnliche Werte (Tab. 32). Insgesamt zeigte sich eine geringe Ausprägung aller Kriterien. Entzündungsreaktionen konnten in keiner der beiden Gruppen vorgefunden werden.

Im Gruppenvergleich zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe zeigten die Ergebnisse der histologischen Untersuchung des Plexus brachialis der rechten Seite keinen statistisch signifikanten Unterschied.



Tier	VG	KG
1	2	1
2	4	1
3	4	4
4	3	4
5	2	5
6	1	3
7	4	2
8	2	3
9	4	2
p-Wert	W = 43, p = 0.8063	

**Tab. 33** Ergebnisse der histologischen Untersuchung der rechten Seite im Gruppenvergleich

**Abb. 39** Ergebnisse der histologischen Untersuchung der rechten Seite im Gruppenvergleich

### Plexus brachialis der linken Seite:

	Nervenfaserdichte	Homogenität Fasergröße	Gefäßdichte	Auftreten von Vakuolen	Fibrose	Entzündungsreaktion
<b>Grad 0</b>	stark	stark	stark	keine	keine	keine
<b>Grad 1</b>	deutlich	deutlich	deutlich	gering	gering	gering
<b>Grad 2</b>	gering	gering	gering	deutlich	deutlich	deutlich
<b>Grad 3</b>	kaum	kaum	kaum	stark	stark	stark

**Tab. 34** Ausprägung der Kriterien in Grade

Versuchsgruppe

Tier	Nervenfaserdichte	Homogenität Fasergröße	Gefäßdichte	Auftreten von Vakuolen		Fibrose		Entzündungsreaktion	
	Grad	Grad	Grad	Grad	Auftreten	Grad	Auftreten	Grad	Auftreten
1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	1	0	0	2	1	0	0
3	1	1	0	1	1	1	2	0	0
4	0	0	1	1	1	2	2	1	1
5	1	1	0	0	0	1	1	0	0
6	2	1	1	2	2	1	1	0	0
7	1	1	1	1	1	1	2	0	0
8	1	1	0	1	1	0	0	1	1
9	0	0	0	0	0	1	2	0	0

Kontrollgruppe

Tier	Nervenfaserdichte	Homogenität Fasergröße	Gefäßdichte	Auftreten von Vakuolen		Fibrose		Entzündungsreaktion	
	Grad	Grad	Grad	Grad	Auftreten	Grad	Auftreten	Grad	Auftreten
1	1	1	1	2	2	1	1	0	0
2	1	1	2	2	1	2	3	2	1
3	1	1	1	1	1	1	1	0	0
4	1	1	1	1	2	1	1	1	1
5	2	2	3	2	2	2	2	0	0
6	1	1	2	1	1	2	1	2	1
7	2	1	1	1	1	0	0	0	0
8	2	2	3	2	2	1	2	1	1
9	2	1	1	1	2	1	2	0	0

**Tab. 35** Histologische Beurteilung des Plexus brachialis der linken Seite in Grade

Versuchsgruppe

Tier	Nervenfaserdichte	Homogenität Fasergröße	Gefäßdichte	Auftreten von Vakuolen	Fibrose	Entzündungsreaktion	Ergebnis
1	1	1	1	0	0	0	3
2	0	0	1	0	2	0	3
3	1	1	0	1	2	0	5
4	0	0	1	1	4	1	7
5	1	1	0	0	1	0	3
6	2	1	1	4	1	0	9
7	1	1	1	1	2	0	6
8	1	1	0	1	0	1	4
9	0	0	0	0	2	0	2
Summe							42

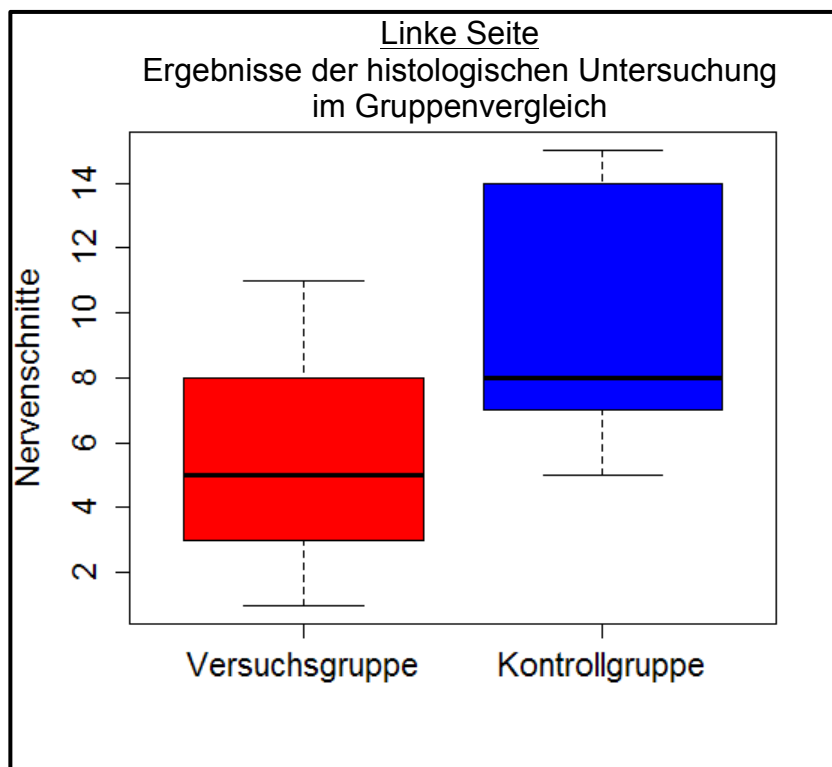
Kontrollgruppe

Tier	Nervenfaserdichte	Homogenität Fasergröße	Gefäßdichte	Auftreten von Vakuolen	Fibrose	Entzündungsreaktion	Ergebnis
1	1	1	1	4	1	0	8
2	1	1	2	2	6	2	14
3	1	1	1	1	1	0	5
4	1	1	1	2	1	1	7
5	2	2	3	4	4	0	15
6	1	1	2	1	2	2	9
7	2	1	1	1	0	0	5
8	2	2	3	4	2	1	14
9	2	1	1	2	2	0	8
Summe							85

**Tab. 36** Ergebnisse der histologischen Untersuchung des Plexus brachialis der linken Seite

Die histologischen Ergebnisse des Plexus brachialis der operierten linken Seite zeigten im Vergleich zur nicht operierten rechten Seite deutlich höhere Werte (Tab. 36). Außerdem ließen sich zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe größere Unterschiede in den Ergebnissen feststellen. In der Summe zeigte sich eine mehr als doppelt so starke Ausprägung aller Kriterien in der Kontrollgruppe.

Im Gruppenvergleich zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe zeigten die Ergebnisse der histologischen Untersuchung des Plexus brachialis der linken Seite einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 40** Ergebnisse der histologischen Untersuchung der linken Seite im Gruppenvergleich

Tier	VG	KG
1	3	8
2	3	14
3	5	5
4	7	7
5	3	15
6	9	9
7	6	5
8	4	14
9	2	8
p-Wert	W = 11, p = 0.008104	

**Tab. 37** Ergebnisse der histologischen Untersuchung der linken Seite im Gruppenvergleich

### 3.4.2 Quantifizierung der VEGF-Expression durch Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Quantifizierung der VEGF-Expression im Plexus brachialis mittels ELISA soll dem Nachweis einer erfolgreichen Gentherapie dienen und darüber hinaus einen Vergleich der VEGF-Konzentration in den untersuchten Präparaten ermöglichen. Für jedes Präparat erfolgte die Bestimmung von pg VEGF/g Gewebe, pg VEGF/ $\mu$ g Protein sowie  $\mu$ g Protein/g Gewebe. Um die VEGF-Konzentration in den unterschiedlichen Präparaten besser vergleichen zu können, wurden alle Ergebnisse auf 100 mg Gewebeprobe hochgerechnet. Die Bestimmung erfolgte in insgesamt 6 Präparaten aus 4 unterschiedlichen Tieren.

Präparate	Beschreibung	Behandlung
VG PL 1	Versuchsgruppe / Plexus links / Tier 1	AdCMV.VEGF <sub>165</sub>
VG PL 2	Versuchsgruppe / Plexus links / Tier 2	AdCMV.VEGF <sub>165</sub>
KG PL 1	Kontrollgruppe / Plexus links / Tier 1	NaCl 0,9%
KG PL 2	Kontrollgruppe / Plexus links / Tier 2	NaCl 0,9%
KG PR 1	Kontrollgruppe / Plexus rechts / Tier 1	Keine
KG PR 2	Kontrollgruppe / Plexus rechts / Tier 2	Keine

**Tab. 38** Beschreibung und Behandlung der untersuchten Plexus

Bei den Präparaten VG PL 1 und VG PL 2 handelte es sich jeweils um den linken Plexus brachialis von zwei Tieren aus der Versuchsgruppe. Bei diesen Tieren wurde sowohl die Operation mit Quetschung der entsprechenden Nervenwurzeln, als auch die postoperative Behandlung mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> durchgeführt. Bei den Präparaten KG PL 1 und KG PL 2 handelte es sich jeweils um den linken Plexus brachialis von zwei Tieren aus der Kontrollgruppe. Bei diesen Tieren wurde ebenfalls die Operation mit Quetschung der entsprechenden Nervenwurzeln durchgeführt, jedoch folgte eine postoperative Behandlung mit NaCl 0,9%. Von den gleichen Tieren wurde auch der unbehandelte rechte Plexus brachialis entfernt. Bei den entsprechenden Präparaten KG PR 1 und KG PR 2 soll vergleichend zu den



behandelten Plexus die VEGF-Konzentration in unbehandelten Plexus bestimmt werden.

Versuchsgruppe

Präparate	Gewicht in g	pg VEGF/g Gewebe	pg VEGF/ $\mu$ g Protein	$\mu$ g Protein/g Gewebe
VG PL 1	0,015	77603,88	1,6	48360
VG PL 2	0,033	408015,03	12,52	32557,57

Kontrollgruppe

Präparate	Gewicht in g	pg VEGF/g Gewebe	pg VEGF/ $\mu$ g Protein	$\mu$ g Protein/g Gewebe
KG PL 1	0,038	2110,86	0,08	25302,63
KG PL 2	0,054	54561,77	2,39	22822,22
KG PR 1	0,031	85001,87	2,44	34700
KG PR 2	0,092	42838,67	1,22	17556,83

**Tab. 39** Gewicht (g), VEGF-Konzentration (pg/g) und Proteingehalt ( $\mu$ g/g) der Präparate

Rang	Präparat	pg VEGF/g Gewebe
1	VG PL 2	408015,03
2	KG PR 1	85001,87
3	VG PL 1	77603,88
4	KG PL 2	54561,77
5	KG PR 2	42838,67
6	KG PL 1	2110,86

**Tab. 40** VEGF-Konzentration (pg/g) der Präparate in absteigender Reihenfolge

Die Ergebnisse zeigten deutliche Abweichungen der VEGF-Konzentration in den unterschiedlichen Präparaten (Tab. 39). In der Auswertung wurden die Präparate absteigend ihrer Konzentration von pg VEGF/g Gewebe in eine Rangordnung eingeteilt (Tab. 40). Sowohl in den mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> behandelten als auch in unbehandelten Präparaten wurde VEGF nachgewiesen. Bei dem Präparat mit der höchsten VEGF-Konzentration handelte es sich um den linken Plexus brachialis eines Tieres aus der Versuchsgruppe, der mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> behandelt wurde (Präparat VG PL 2). Das Präparat mit der zweithöchsten Konzentration (Präparat KG PR 1) enthielt fast 80% weniger VEGF als das Präparat mit der höchsten Konzentration. Hierbei handelte es sich um den rechten Plexus brachialis eines Tieres aus der Kontrollgruppe, der keiner Behandlung unterzogen wurde. Nur etwas geringer war die dritthöchste VEGF-Konzentration, die in einem linken Plexus brachialis eines Tieres aus der Versuchsgruppe gemessen wurde, der mit

AdCMV.VEGF<sub>165</sub> behandelt wurde (Präparat VG PL 1). An nächster Stelle stand ein Präparat, bei dem es sich um den linken Plexus brachialis eines Tieres aus der Kontrollgruppe handelte, der mit NaCl 0,9% behandelt wurde (Präparat KG PL 2). Die fünftöchste VEGF-Konzentration wurde erneut in einem rechten Plexus brachialis eines Tieres aus der Kontrollgruppe gemessen, der nicht behandelt wurde (Präparat KG PR 2). Die mit Abstand niedrigste Konzentration von VEGF enthielt der linke Plexus brachialis eines Tieres aus der Kontrollgruppe, der mit NaCl 0,9% behandelt wurde.

<b>VG PL 1</b>	77603,88
<b>VG PL 2</b>	408015,03
<b>Summe</b>	485618,91

<b>KG PL 1</b>	2110,86
<b>KG PL 2</b>	54561,77
<b>Summe</b>	56672,63

<b>KG PL 1</b>	2110,86
<b>KG PL 2</b>	54561,77
<b>Summe</b>	56672,63

<b>KG PR 1</b>	85001,87
<b>KG PR 2</b>	42838,67
<b>Summe</b>	127840,54

**Tab. 41** VEGF-Konzentration (pg/g) der operierten linken Plexus im Gruppenvergleich

**Tab. 42** VEGF-Konzentration (pg/g) der Plexus aus der Kontrollgruppe im Seitenvergleich

<b>Versuchsgruppe</b>	485618,91
<b>Kontrollgruppe</b>	56672,63
<b>Abweichung</b>	88,33%

**Tab. 43** Abweichung (%) der VEGF-Konzentration (pg/g) der operierten linken Plexus im Gruppenvergleich

Der Gruppenvergleich von pg VEGF/g Gewebe in den behandelten linken Plexus zeigte in der Summe, dass die VEGF-Konzentration in den mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> behandelten Plexus der Tiere aus der Versuchsgruppe um fast 90% höher als in den mit NaCl 0,9% behandelten Plexus der Tiere aus der Kontrollgruppe war (Tab. 43). Der Seitenvergleich von pg VEGF/g Gewebe in den Plexus der Tiere aus der Kontrollgruppe zeigte eine mehr als doppelt so hohe VEGF-Konzentration in den unbehandelten rechten, als in den mit NaCl 0,9% behandelten linken Plexus (Tab. 42).



---

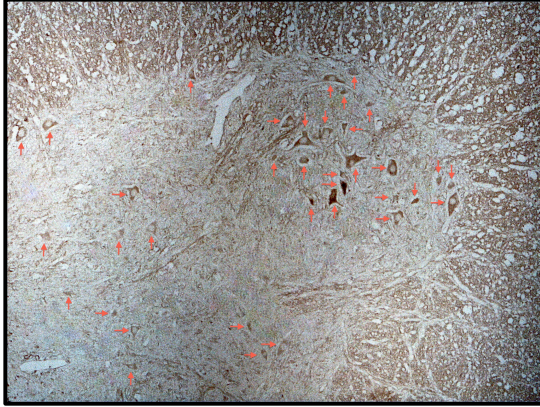
## 3.5 Untersuchung des Rückenmarks

### 3.5.1 Zählung der $\alpha$ -Motoneurone

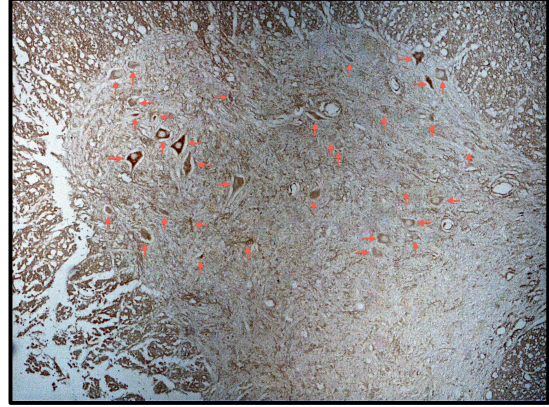
Die Zählung der Motoneurone erfolgte in den angefertigten Schnitten des Segments C5 aller Ratten. Dabei soll ein Unterschied im Überleben der Motoneurone nach dem zugeführten Nervenschaden zwischen der mit AdVEGF behandelten Versuchsgruppe und der mit NaCl 0,9% behandelten Kontrollgruppe untersucht werden. Es wurden die Motoneurone des linken und rechten Vorderhorns eines jeden Tieres gezählt und die Differenz berechnet. In die Zählung gingen alle Motoneurone mit ein, deren Zellkörper eindeutig erkennbar waren. Da der rechten Seite kein Nervenschaden zugeführt wurde, konnte diese als gesunder, unbehandelter Vergleich zur linken Seite dienen.

Im Anschluss wurde die Summe der Differenzen aller Tiere der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe berechnet und die Ergebnisse beider Gruppen miteinander verglichen. Je höher die Differenz in einer Behandlungsgruppe war, desto größer war der Verlust der Motoneurone und somit eine Degeneration ausgeprägt. Der Quotient aus der Summe der Anzahl der Motoneurone der rechten Seite durch die Summe der Anzahl der Motoneurone der linken Seite soll Aufschluss über das Ausmaß der Abweichung geben. Die Untersuchungen am Mikroskop (Axio Scope, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) erfolgten bei 10-facher Vergrößerung (Plan-Neofluar<sup>®</sup>, Ph1, 10x / 0,3, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen).

Bilder aus den histologischen Untersuchungen des Rückenmarks (Anti-CGRP-Antikörper-Färbung):



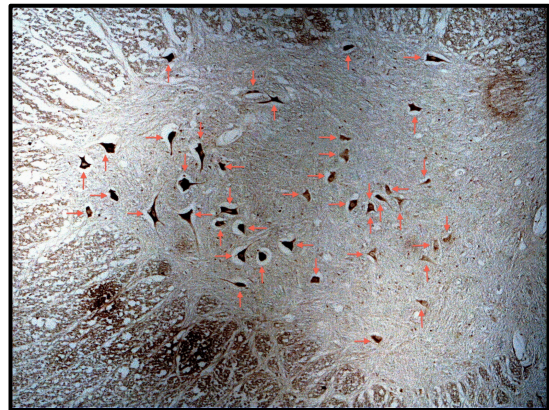
**Abb. 41** Rechte Seite eines Tieres aus der Versuchsgruppe mit 36 Motoneuronen



**Abb. 42** Linke Seite des Tieres aus Abb. 41 mit 34 Motoneuronen, Differenz: 2



**Abb. 43** Rechte Seite eines Tieres aus der Kontrollgruppe mit 52 Motoneuronen



**Abb. 44** Linke Seite des Tieres aus Abb. 43 mit 41 Motoneuronen, Differenz: 11

Versuchsgruppe				Kontrollgruppe			
Tier	rechts	links	Differenz	Tier	rechts	links	Differenz
1	36	34	2	1	38	23	15
2	26	21	5	2	56	46	10
3	31	26	5	3	29	18	11
4	30	29	1	4	60	47	13
5	17	13	4	5	52	41	11
6	35	31	4	6	34	23	11
7	25	22	3	7	22	11	11
8	28	25	3	8	23	10	13
9	30	25	5	9	31	18	13
Summe	258	226	32	Summe	345	237	108
Quotient	1,14159292			Quotient	1,455696203		

**Tab. 44** Ergebnisse der Zählung der Motoneurone in den Behandlungsgruppen

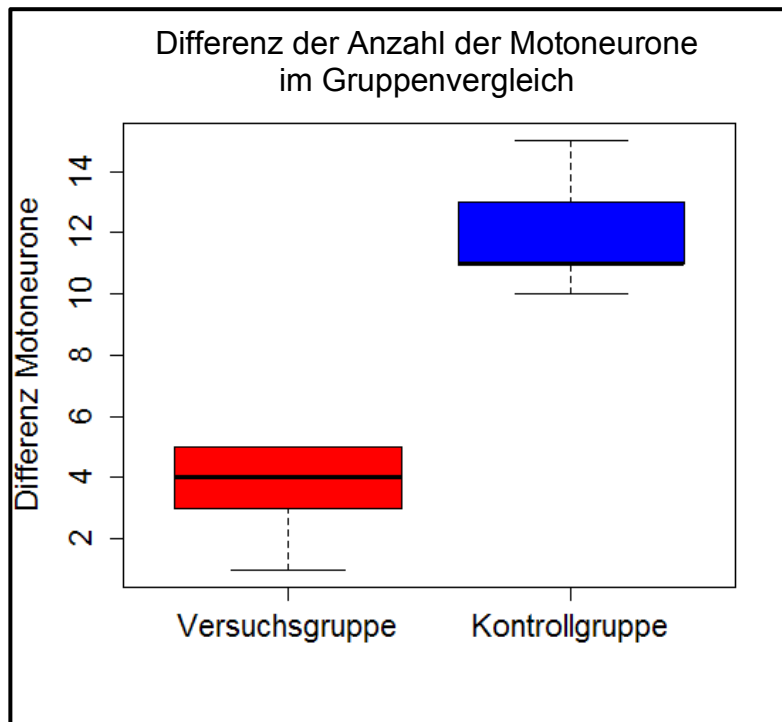
Versuchsgruppe		Kontrollgruppe		Gruppenvergleich	
Rechts	1	Rechts	1	Versuchsgruppe	12,40%
Links	1,14159292	Links	1,4556962	Kontrollgruppe	31,30%
Abweichung	12,40%	Abweichung	31,30%	Abweichung	60,38%

**Tab. 45** Abweichung (%) der Anzahl der Motoneurone der Behandlungsgruppen im Seitenvergleich

**Tab. 46** Abweichung (%) der Anzahl der Motoneurone im Gruppenvergleich

Die Zählung der Motoneurone ergab in beiden Behandlungsgruppen unterschiedlich stark ausgeprägte Differenzen in der Anzahl der Motoneurone zwischen der rechten und linken Seite (Tab. 44). In der Kontrollgruppe wurden auf der unbehandelten rechten Seite etwa 25% mehr Motoneurone als auf entsprechender Seite in der Versuchsgruppe gezählt. Die Summe der Differenzen in der Anzahl der Motoneurone zwischen der rechten und linken Seite betrug in der Versuchsgruppe 32 Zellen bei einer Abweichung von 12,4% (Tab. 45). In der Kontrollgruppe betrug die Summe der Differenzen 108 Zellen bei einer Abweichung von 31,3%. Der Gruppenvergleich zeigte, dass 60,38% mehr Motoneurone in der Versuchsgruppe als in der Kontrollgruppe vorgefunden wurden (Tab. 46).

Im Gruppenvergleich zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe konnte ein statistisch signifikanter Unterschied in den Differenzen der Anzahl der Motoneurone festgestellt werden ( $p < 0,05$ ).



Tier	VG	KG
1	2	15
2	5	10
3	5	11
4	1	13
5	4	11
6	4	11
7	3	11
8	3	13
9	5	13
p-Wert	W = 0, p = 0.00004114	

**Tab. 47** Differenzen der Anzahl der Motoneurone im Gruppenvergleich

**Abb. 45** Differenzen der Anzahl der Motoneurone im Gruppenvergleich

---

## 4. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Therapie mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> führte im Vergleich zur Behandlung mit NaCl 0,9% zu einer fast 90% höheren VEGF-Konzentration im behandelten Gewebe.
- Auf funktioneller Ebene ließen sich ausgeprägtere Defizite in der Kontrollgruppe feststellen.
- Die Gewichtsbestimmung des M. deltoideus der operierten Seite zeigte eine geringere Reduzierung der Muskelmasse in der Versuchsgruppe.
- Durch die histologische Untersuchung des M. deltoideus konnte eine stärker ausgeprägte Degeneration der operierten Seite in der Kontrollgruppe festgestellt werden.
- Die histologische Untersuchung des Plexus brachialis der operierten Seite zeigte eine signifikant geringer ausgeprägte Nervendegeneration in der Versuchsgruppe.
- Die Zählung der  $\alpha$ -Motoneurone im Rückenmark erbrachte eine signifikant größere Anzahl überlebender Motoneurone in der Versuchsgruppe.

Zur Diskussion steht die Quantifizierung der VEGF-Expression im behandelten Gewebe im Hinblick auf eine erfolgreiche Gentherapie. Die Ergebnisse aus den Verhaltensuntersuchungen und deren Zusammenhang mit der durchgeführten Therapie sollen erörtert werden. Ebenfalls werden die Resultate aus den Untersuchungen des M. deltoideus und des Plexus brachialis kritisch diskutiert. Zum Schluss wird sich mit dem Überleben der  $\alpha$ -Motoneurone im Rückenmark durch die VEGF-Therapie in Bezug auf eine ergänzende Therapie bei der geburtstraumatischen Plexusparese auseinander gesetzt.

#### 4.1 Steigerung der VEGF-Expression durch AdCMV.VEGF<sub>165</sub>

In den mittels ELISA untersuchten Präparaten konnte durch die Bestimmung der VEGF-Konzentration ein Rückschluss auf dessen Expression im Gewebe gezogen werden. Es gilt zu klären, ob die Gentherapie mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> die VEGF-Expression beeinflusst hat.

Sowohl in den mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> und NaCl 0,9% behandelten, als auch in unbehandelten Präparaten wurde VEGF nachgewiesen. Diese Beobachtung ist durch das natürliche Vorkommen von VEGF in vaskularisiertem Gewebe begründet. In Voruntersuchungen konnte eine systemische Wirkung von AdCMV.VEGF<sub>165</sub> ausgeschlossen werden. Die durchgeführte Gentherapie führt zu einer lokal begrenzten VEGF-Expression, dessen Effekt nur auf das entsprechend therapierte Gewebe beschränkt ist. Aus der Kontrollgruppe lagen Plexus der nicht operierten rechten sowie der operierten und mit NaCl 0,9% behandelten linken Seite vor. Im Seitenvergleich von pg VEGF/g Gewebe zeigte sich hier eine mehr als doppelt so hohe Konzentration in den unbehandelten rechten, als in den mit NaCl 0,9% behandelten linken Plexus. Dies lässt auf eine erhöhte Eigensynthese von VEGF im gesunden Gewebe schließen. Die durch den Schaden entstandene Parese der vorderen linken Extremität führt zu einer Funktionseinschränkung mit konsekutiver Überbelastung der vorderen rechten Extremität. Aufgrund dieser Disbalance kommt es hier zu einer Hypertrophie der Muskulatur, die mit einer erhöhten Vaskularisierung des Gewebes einhergeht. Induziert wird diese durch freigesetztes VEGF, wodurch dessen höhere Konzentration in den rechten Plexus im Vergleich zu den linken Plexus begründet sein kann. Es wird deutlich, dass die Behandlung des Gewebes mit NaCl 0,9% nicht zu einer vermehrten VEGF-Expression in der Kontrollgruppe führte.

Aus den Ergebnissen des ELISA ließ sich lediglich in einem Präparat eine im Vergleich zu den anderen Präparaten drastisch erhöhte VEGF-Konzentration bestimmen. Diese Konzentration war mehr als 70% so hoch, als die durchschnittliche VEGF-Konzentration aller Präparate zusammen. Sie wurde in einem mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> behandelten Präparat aus der Versuchsgruppe

nachgewiesen (Präparat VG PL 2, Tab. 40). Das zweite mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> behandelte Präparat aus der Versuchsgruppe (Präparat VG PL 1) wies im Vergleich zu den restlichen Präparaten aus der Kontrollgruppe keinen eindeutigen Unterschied der VEGF-Konzentration auf. Im Rahmen einer erfolgreichen Gentherapie wäre hier ebenfalls eine überdurchschnittliche Erhöhung der VEGF-Konzentration zu erwarten gewesen. Im Gewichtsvergleich wurde jedoch deutlich, dass dieses Präparat über die geringste Masse verfügte (Tab. 39). Hier lässt sich eine nicht ausreichende Entnahme des Plexus brachialis vermuten. Dies könnte zu entsprechend niedrigem Ergebnis geführt haben und die wahre, womöglich höhere VEGF-Konzentration kaschieren.

Der Gruppenvergleich der VEGF-Konzentration in den behandelten linken Plexus zeigte in der Summe hingegen einen eindeutigen Unterschied zwischen der Behandlung mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> und NaCl 0,9% (Tab. 41). Insgesamt konnte eine um fast 90% höhere VEGF-Konzentration in den operierten linken Plexus der Versuchsgruppe bestimmt werden (Tab. 43). Dieses Ergebnis ließ auf eine induzierte Steigerung der VEGF-Expression durch AdCMV.VEGF<sub>165</sub> im behandelten Gewebe und den damit verbundenen Erfolg der Gentherapie schließen.

## 4.2 Effekt der VEGF-Therapie auf funktioneller Ebene

Die Verhaltensuntersuchungen gaben Aufschluss über die Nervenregeneration auf funktioneller Ebene. Im Folgenden sollen Gründe für intraindividuelle Schwankungen der Ergebnisse über den Versuchszeitraum diskutiert werden. Außerdem wird auf die Besonderheiten bei der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse verwiesen.

Beim Grid-Walk-Test ist die Ursache für die teilweise hohen Raten an Fehlritten bei Tieren, die in der vorherigen Versuchswoche niedriger waren, durch eine mögliche Unlust, die Leiter überqueren zu wollen, erklärbar (Tab. 9). Diese Unlust könnte durch den sich im Laufe des Tages natürlich wechselnden Gemütszustand der Tiere hervorgerufen sein. Eine weitere Möglichkeit könnte eine neu aufgetretene Angst oder Unsicherheit gewesen sein, die sich bei den Tieren entwickelt hat. Gründe hierfür können sowohl eine in der Zwischenzeit zugenommene Parese, als auch eine

erlernte negative Erfahrung mit ähnlichen Bewegungsabläufen sein. Da die Tiere zwischen den Versuchswochen ihren natürlichen Gewohnheiten nachgehen konnten, bestand die Möglichkeit zur Entwicklung unterschiedlicher Strategien mit der eingeschränkten Funktion der operierten Extremität umzugehen. Diese veränderten Anpassungen können die Ursache für intraindividuelle Schwankungen beim Grid-Walk-Test gewesen sein. Die Mittelwerte der Fehlritte zeigten im Verlauf einen stärkeren Rückgang der Anzahl von Fehlritten in der Versuchsgruppe (Abb. 14). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen konnte jedoch nicht festgestellt werden (Tab. 10). Beim Überqueren einer 1 m über dem Boden horizontal ausgerichteten Leiter haben neben der funktionellen Einschränkung durch die Parese auch psychische Faktoren Einfluss auf die Resultate. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Fehlritte ausschließlich aufgrund funktioneller Beeinträchtigung entstanden sind. Die Ergebnisse des Grid-Walk-Tests müssen demnach als eingeschränkt repräsentativ für die tatsächliche funktionelle Leistung im Zusammenhang mit der Nervenregeneration betrachtet werden.

Obwohl die vordere rechte Extremität keiner Operation unterzogen wurde und somit keine Funktionseinschränkungen zu erwarten wären, war zu Beginn des Hebe-Tests auch hier eine verminderte maximale Kraft im Vergleich zum Versuchsende festzustellen (Abb. 16). Der Grund dafür liegt womöglich in der größeren Beanspruchung der vorderen rechten Extremität, die eine Funktionseinschränkung der operierten linken Extremität auszugleichen versuchte. Diese Disbalance kann zu einer Überbelastung führen und die Ursache für eine anfängliche Kraftminderung der rechten Seite gewesen sein. Des Weiteren ist ein Kraftanstieg zwischen Beginn und Versuchsende dadurch erklärbar, dass es im entsprechenden Versuchszeitraum von 11 Wochen zu einem natürlichen Muskelwachstum der Jungtiere gekommen ist. Der Hebe-Test prüft primär auf die maximale Kraft der Greifbewegung, die durch die zugeführte Erb'sche Parese nicht unbedingt eingeschränkt sein muss. Die vorsichtig am Schwanz angehobene Ratte suchte bei diesem Test mit ihren frei in der Luft tastenden Vorderpfoten automatisch nach einem sicheren Halt, der in diesem Fall der Griff der Messvorrichtung darstellte. Auch beim zunehmenden Anheben versuchte die Ratte instinktiv den Halt am Griff nicht zu verlieren. Dabei benutzte sie nicht nur die Greifbewegung der Hand, sondern setzte ab einem bestimmten



---

Zeitpunkt auch die Funktion des Ellenbogengelenks sowie des Schultergelenks ein. Somit lassen sich die Messergebnisse des Hebe-Tests stellvertretend für die Regeneration des gesamten Bewegungsapparats der oberen Extremität interpretieren. Ein signifikanter Unterschied der maximalen Kraft im intraindividuellen Seitenvergleich war zu erwarten, da die nicht operierte rechte Seite in der Kraftausübung nicht eingeschränkt war (Tab. 12 und 13). Hier wurde lediglich deutlich, wie stark die operierte Seite durch den Nervenschaden beeinträchtigt gewesen ist. Die Mittelwerte der operierten linken Seite zeigten im Verlauf eine stärkere Zunahme der Kraftentwicklung in der Versuchsgruppe (Abb. 16). Ein signifikanter Unterschied zu Gunsten der Versuchsgruppe ließ sich dabei jedoch nicht feststellen. Wie beim Grid-Walk-Test zeigten sich auch in den Messergebnissen dieser Untersuchung in beiden Behandlungsgruppen Schwankungen der Werte im Verlauf. Die Gründe hierfür sind denen des Grid-Walk-Tests identisch. Die Ergebnisse des Hebe-Tests stellten den zuletzt gemessenen Wert vor dem Loslassen der Messvorrichtung dar. Bis zu diesem Wert reichte dem entsprechend die maximale Kraft der Tiere. Bei der Auswertung der Ergebnisse gilt es zu berücksichtigen, dass das Loslassen nicht nur auf eine eingeschränkte Kraft aufgrund der Parese zurückzuführen sein muss. Es ist nicht auszuschließen, dass die Parese bei Tieren mit niedrig gemessenen Werten bereits deutlich rückläufig war, hier jedoch Schmerzen zu einem verfrühten Loslassen geführt haben. Der Hebe-Test gibt eine bestmögliche Aussage zur Steigerung der Kraftentwicklung im Rahmen der Nervenregeneration. Wie die Ergebnisse des Grid-Walk-Tests ist die repräsentative Aussagekraft der Ergebnisse in Bezug auf die Nervenregeneration jedoch auch hier eingeschränkt.

Im Gegensatz zu den willkürlichen Bewegungen, die beim Grid-Walk-Test und Hebe-Test ausgeführt wurden, handelt es sich beim Bewegungsmuster des Grooming-Tests um einen Reflex. Die Applikation des süßen Sirups auf die Schnauze löste eine unwillkürliche Reaktion bei den Tieren aus. Dieses Verhalten würde auch bei Schmerzen ausgeführt werden. Eine sichtbare Bewegungseinschränkung der Tiere wird bei diesem Test also nicht durch Schmerzen verursacht, sondern kann primär auf eine bestehende Parese zurückgeführt werden. Die Mittelwerte des Bewegungsausmaßes der operierten linken Seite zeigten, dass das vollständige

Ausführen einer Abduktion und Ellenbogenflexion in der Versuchsgruppe bereits ab der 9. Woche möglich war (Abb. 20). In der Kontrollgruppe blieb bis zum Versuchsende ein Bewegungsdefizit bestehen. Die Ergebnisse wiesen hier Schwankungen auf, die auf eine unterschiedlich stark ausgeprägte Parese hindeuteten. Bei genauer Betrachtung der Werte fiel auf, dass die scheinbare Zunahme der Parese in der 11. Woche lediglich bei 2 von den 9 Tieren vorhanden war (Tab. 15, Tier 2 und 8). In der vorherigen und folgenden Versuchswoche konnte bei diesen Tieren die Bewegung jedoch fast vollständig ausgeführt werden. Es bleibt zu vermuten, dass die scheinbaren Bewegungsdefizite in diesen Fällen nicht unbedingt auf eine vorübergehende Zunahme der Parese zurückzuführen sind. Hier sollte in Erwägung gezogen werden, dass eine nicht exakt zentrale Applikation des Sirups auf die Schnauze der Tiere womöglich nur eine unilaterale Bewegung der Vorderpfote auslöste und somit eine Parese der kontralateralen Seite vorgetäuscht wurde. Diese Gefahr bestand jedoch in beiden Gruppen und ähnliche Fälle sind in der Versuchsgruppe nicht dokumentiert. Insgesamt konnte man hier ein deutlich schnelleres Wiedererlangen der Funktion erkennen, was auf eine ausgeprägtere Nervenregeneration zurückzuführen ist.

Wie bei allen Verhaltensuntersuchungen an Tieren, waren die einzelnen Ergebnisse in den jeweiligen Versuchswochen vom individuellen Gemütszustand der Tiere abhängig. So müssen vereinzelte Ausreißer der Werte vernachlässigt werden. Hier ist es unwahrscheinlich, dass es zu einer vorübergehenden und teilweise drastischen Verschlechterung des Zustands gekommen war. Andererseits lässt sich diese Tatsache auch nicht ausschließen. Zwischen den unbeobachteten Versuchswochen könnte es bei den Tieren auf unterschiedliche Art und Weise zu einem tatsächlichen Bewegungsdefizit gekommen sein. Dieses muss aber nicht zwangsläufig mit einer zugenommenen Parese in Zusammenhang gestanden haben. Eine genaue Differenzierung des Zustandekommens war aus den dokumentierten Werten nicht möglich. So führten diese statistischen Ausreißer teilweise zu deutlichen Veränderungen des Mittelwerts, wodurch das Ergebnis der gesamten Gruppe negativ beeinflusst wurde. Aber auch unabhängig von diesen Ausnahmen konnte in allen Verhaltensuntersuchungen ein deutlicher Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen zu Gunsten der mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> behandelten

Versuchsgruppe dokumentiert werden. Die Durchführung der entsprechenden Verhaltensuntersuchungen mit einer größeren Anzahl an Tieren pro Versuchsgruppe, hätte diese sichtbaren Unterschiede womöglich auch statistisch signifikant erscheinen lassen. Im Hinblick auf die aufwendige Operation und die folgenden zeitintensiven Untersuchungen, war die maximale Anzahl an Tieren pro Versuchsgruppe im Rahmen dieser Arbeit jedoch limitiert.

### 4.3 VEGF und Nervenregeneration

Während die Ergebnisse der Verhaltensuntersuchungen indirekte Hinweise über das Ausmaß einer stattgefundenen Nervenregeneration gaben, dienten die Untersuchungen des M. deltoideus und des Plexus brachialis der direkten Beurteilung des behandelten Gewebes. Im Rahmen der Gewichtsbestimmung des M. deltoideus sollen die gemessenen Werte interpretiert werden. Darüber hinaus werden die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen des M. deltoideus und des Plexus brachialis im Hinblick auf den Einfluss von VEGF auf die Nervenregeneration diskutiert.

Die Masse des M. deltoideus konnte bei der Gewichtsbestimmung als Indikator für die Nervenregeneration fungieren. Eine Reduzierung dieser deutete auf eine Atrophie des Gewebes hin, was auf eine mangelnde Innervation zurückzuführen ist. Die Muskelmasse der rechten Seite diente dabei als Maßstab für gesundes und adäquat innerviertes Gewebe. Die Differenz zwischen rechter und linker Muskelmasse stand somit für das Ausmaß der Atrophie. Mit jeweils einer Ausnahme pro Gruppe war bei allen Tieren der rechte M. deltoideus schwerer als der Linke, so dass eine positive Differenz entstand (Tab. 17 und 18). Bei den Tieren mit negativer Differenz war der linke M. deltoideus schwerer als der Rechte. Ursache hierfür kann eine durch Schmerzen oder Parese bedingte, beidseitige Ruhestellung der oberen Extremitäten gewesen sein, die auch zu einer Abnahme der Muskelmasse auf der rechten Seite führte. Die Summe der Werte des rechten M. deltoideus war in der Kontrollgruppe höher als in der Versuchsgruppe. Dies kann durch die größere Anzahl von männlichen Ratten in der Kontrollgruppe begründet sein. Die Summe der Werte des linken M. deltoideus war jedoch in der Versuchsgruppe höher als in der

Kontrollgruppe. Dies lässt bereits auf einen insgesamt größeren Unterschied der Muskelmasse zwischen der rechten und der linken Seite in der Kontrollgruppe schließen, der durch die Summe der Differenzen in den jeweiligen Gruppen bestätigt wurde. Anhand der prozentualen Abweichung der Muskelmasse zwischen der linken und der rechten Seite ließen sich diese Unterschiede in den Behandlungsgruppen deutlich darstellen (Tab. 19). Dabei zeigte sich in der Kontrollgruppe eine Abweichung um fast die Hälfte der Muskelmasse (47,23%), während es in der Versuchsgruppe nur etwa ein Drittel war (34,23%). Je stärker die Parese ausgeprägt war, desto größer war die Bewegungseinschränkung der betroffenen Seite. Die geringere Beanspruchung der linken Seite führte zu einer Atrophie mit Verlust der Muskelmasse. Zum anderen kam es aufgrund dieser Bewegungseinschränkung zu einer stärkeren Belastung der rechten Seite, die dadurch überdurchschnittlich an Muskelmasse zunahm. Die Atrophie auf der linken Seite und die Zunahme der Muskelmasse auf der rechten Seite stehen umgekehrt proportional zueinander. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss demnach berücksichtigt werden, dass die Abweichung der Muskelmasse nicht ausschließlich auf die Atrophie der linken Seite, sondern auch auf die Zunahme der Muskelmasse der rechten Seite zurückzuführen ist. Im Gruppenvergleich zeigte sich eine um 27,52% stärkere Atrophie der operierten linken Seite in der mit NaCl 0,9% behandelten Kontrollgruppe (Tab. 20). Im Rahmen der Gewichtsbestimmung ließ sich somit eine ausgeprägtere Reinnervation des Muskels in der mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> behandelten Versuchsgruppe feststellen.

Die durch die Gewichtsbestimmung dargestellte Atrophie der operierten linken Seite konnte auch in den histologischen Untersuchungen nachgewiesen werden. Stellvertretend dafür stehen die Kriterien Muskelfaserdichte und Homogenität der Muskelfasergröße. Die rechte Seite diente auch hier als Maßstab für gesundes und adäquat innerviertes Gewebe. Somit zeigte sich im Seitenvergleich in beiden Gruppen eine Atrophie hauptsächlich bei Präparaten der operierten linken Seite. Gründe dafür können neben einer mangelnden Reinnervation des Muskels mit folgender Immobilität auch eine bewusst geringere Beanspruchung dieser Seite aufgrund von Schmerzen gewesen sein. Die Ergebnisse aller Kriterien zusammen wiesen auf die Ausprägung der Degeneration des Muskels hin. Je höher dieses

Ergebnis ausfiel, desto stärker war die Degeneration ausgeprägt. Im Gruppenvergleich ließen sich bei der operierten linken Seite deutliche Unterschiede in den Ergebnissen feststellen (Tab. 28). Demnach konnte durch die histologische Untersuchung des M. deltoideus eine stärkere Degeneration in der mit NaCl 0,9% behandelten Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Gleichzeitig ließ dies auf eine ausgeprägtere Reinnervation des Muskels in der mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> behandelten Versuchsgruppe schließen.

Die histologische Untersuchung des Plexus brachialis erlaubte eine direkte Beurteilung des Nervengewebes anhand festgelegter Kriterien. Auch hier wiesen die Ergebnisse aller Kriterien zusammen auf die Ausprägung der Degeneration des Gewebes hin. Je höher dieses Ergebnis ausfiel, desto stärker war die Degeneration ausgeprägt. Gleichzeitig ließ sich dadurch ein Rückschluss auf das Ausmaß der Nervenregeneration ziehen. Die rechte Seite diente hier ebenfalls als Maßstab für gesundes Gewebe. Im Seitenvergleich zeigte sich somit auch hier in beiden Gruppen eine stärker ausgeprägte Degeneration beim operierten linken Plexus brachialis. Neben dem direkten Einfluss von VEGF auf die Nervenregeneration spielte dabei auch dessen Einfluss auf die Vaskularisierung des Gewebes eine Rolle.<sup>130</sup> Eine ausreichende Blutzufuhr zum verletzten Nerv ist entscheidend für das Überleben und die funktionelle Integrität der Axone.<sup>116</sup> Zugleich führt die unzureichende Gewebepfusion nach einem Nervenschaden zur mangelnden Regeneration des Gewebes mit vermehrtem Untergang von Nervenzellen. Die sich daraus entwickelnde Faserdegeneration konnte in den histologischen Untersuchungen zum einen durch das vermehrte Auftreten von Vakuolen zwischen den Nervenfasern festgestellt werden. Zum anderen durch die verringerte Nervenfaserdichte sowie die Abnahme der Homogenität der Nervenfasern. Das irreversibel untergegangene Nervengewebe wurde durch Bindegewebe ersetzt, so dass die Fibrose ebenfalls hinweisend für eine bestehende Faserdegeneration war. Die Ausprägung der Gefäßdichte kann durch den direkten Einfluss von VEGF auf die Vaskularisierung des Gewebes zurückgeführt werden. Alle Kriterien, die auf eine vermehrte Nervendegeneration hindeuteten, waren in der Kontrollgruppe stärker ausgeprägt (Tab. 36). Hier konnte auch eine geringere Gefäßdichte als in der Versuchsgruppe festgestellt werden. Diese war in der Versuchsgruppe bei allen

Präparaten deutlich bis stark ausgeprägt. Im Gruppenvergleich bestätigten die Ergebnisse aller Kriterien zusammen, dass es in der mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> behandelten Versuchsgruppe zu einer signifikant geringer ausgeprägten Nervendegeneration nach dem zugeführten Schaden gekommen ist (Tab. 37).

#### 4.4 Einfluss von VEGF auf das Überleben von Motoneuronen

Die in der mikroskopischen Untersuchung des Plexus brachialis nachgewiesene Degeneration des Nervengewebes hat unmittelbare Auswirkungen auf das Überleben der Motoneurone im Rückenmark. In diesem Zusammenhang sollen die Ergebnisse aus der Zählung der Motoneurone im Hinblick auf den protektiven Einfluss von VEGF erörtert werden.

Ursache für das Absterben reifender Motoneurone nach einem peripheren Nervenschaden kann die fehlende Interaktion zu ihren Zielstrukturen sein. Diese ist während der frühen postpartalen Periode unerlässlich.<sup>73</sup> Eine Unterbrechung der Interaktion durch Nervenverletzungen in dieser kritischen Phase führt zum Absterben der entsprechenden Motoneurone im Rückenmark.<sup>107</sup> Durch eine verbesserte Regeneration der geschädigten peripheren Nerven soll dieses Absterben reduziert werden. Die Zählung der Motoneurone im Seitenvergleich erlaubte einen Rückschluss auf das Ausmaß der durch den Nervenschaden untergegangenen Zellen zu ziehen. Die Anzahl der Motoneurone auf der rechten Seite diente als Maßstab für den unverletzten Plexus brachialis. Die Differenz zwischen rechter und linker Seite stellte somit die Anzahl untergegangener Motoneurone dar. Die Ergebnisse zeigten in der Kontrollgruppe eine um etwa 25% größere Anzahl von Motoneuronen auf der unbehandelten rechten Seite im Vergleich zu entsprechender Seite in der Versuchsgruppe (Tab. 44). Diese Tatsache steht womöglich damit in Zusammenhang, dass auch bei der Gewichtsbestimmung des M. deltoideus eine insgesamt ausgeprägtere Muskelmasse auf der unbehandelten rechten Seite in der Kontrollgruppe festgestellt wurde. Grund hierfür könnte die größere Anzahl von männlichen Tieren in der Kontrollgruppe sein, bei denen eine höhere Dichte von Motoneuronen im Vorderhorn mit einer ausgeprägteren Muskulatur einherging. Die Summe der Differenzen zwischen

---

rechter und linker Seite zeigte im Gruppenvergleich einen deutlich ausgeprägteren Untergang von Motoneuronen in der Kontrollgruppe (Tab. 44). Die prozentuale Abweichung der Anzahl der Motoneurone im Seitenvergleich bestätigte diesen Unterschied (Tab. 45). So ist es in der Kontrollgruppe nach dem zugeführten Nervenschaden zu einem Verlust von 31,3% der Motoneurone gekommen. In der Versuchsgruppe konnte nur ein Verlust von 12,4% festgestellt werden. Der Gruppenvergleich machte deutlich, dass das Überleben von Motoneuronen in der mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> behandelten Versuchsgruppe um 60,38% im Vergleich zu der mit NaCl 0,9% behandelten Kontrollgruppe gesteigert werden konnte (Tab. 46). Die Ergebnisse aus der Zählung der Motoneurone zeigten, dass das Absterben der Motoneurone durch die Therapie mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> signifikant reduziert werden konnte (Tab. 47).

#### 4.5 AdVEGF<sub>165</sub> als ergänzende Therapie bei der geburtstraumatischen Plexusparese

Basierend auf den Ergebnissen der durchgeführten Untersuchungen bleibt festzuhalten, dass die Nervenregeneration nach einem zugeführten Quetschtrauma durch eine adenovirale Gentherapie mit VEGF<sub>165</sub> im Tiermodell deutlich verbessert werden konnte. Bei der geburtstraumatischen Parese des Plexus brachialis beim Menschen liegt ein komplexes Schädigungsmuster vor, dass von leichten Dehnungen bis hin zu kompletten Ausrissen der Nervenwurzeln aus dem Rückenmark reicht. Ein Quetschtrauma führt zu einem umschriebenen Schaden, der weder mit dem einer Dehnung, noch einer kompletten Durchtrennung des Nervs zu vergleichen ist. Allen Verletzungen gemeinsam scheint jedoch die durch den Schaden gestörte Interaktion zwischen Motoneuron und Zielstruktur zu sein. Je ausgeprägter und länger diese anhält, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass entsprechende Motoneurone im Rückenmark absterben und eine irreversible Parese die Folge ist.

Als Therapiemaßnahmen bei der geburtstraumatischen Plexusparese stehen heutzutage die konservative Therapie, die operative Rekonstruktion des Plexus

brachialis sowie motorische Ersatzoperationen durch Muskeltransfer zur Verfügung. Durch die konservative Behandlung in Form einer Physiotherapie kann die Rückbildung der Symptome bereits innerhalb weniger Wochen erreicht werden. Doch auch ohne diese tritt eine spontane Rückbildung bei etwa der Hälfte der Betroffenen nach 3 Monaten auf. Nach 18 Monaten ist der Großteil (82%) beschwerdefrei, jedoch erlangt der Rest der Patienten auch im weiteren Verlauf keine vollständige Funktion der betroffenen Extremität mehr.<sup>66</sup> Bei diesen Patienten ist auch im weiteren Verlauf keine entscheidende Besserung zu erwarten, da nach 2 Jahren von einer abgeschlossenen Reinnervation ausgegangen werden muss. Wurden hier keine operativen Rekonstruktionen des Plexus brachialis im Säuglingsalter durchgeführt, stellen die operativen Ersatzoperationen durch Muskeltransfer die einzige Möglichkeit zur Verbesserung des Krankheitsbilds dar. Die hohe Rate spontaner Rückbildungen der Symptome betroffener Patienten ist maßgeblich auf die geringe Ausprägung des Nervenschadens in Form von Dehnungen zurückzuführen. Hierbei ist es nie zu einer gestörten Interaktion zwischen Motoneuron und Zielstruktur gekommen. In diesen Fällen mit leichter Verletzung ist die spontane Nervenregeneration ausreichend. Bei ausgeprägteren Verletzungen jedoch reicht diese häufig nicht zur vollständigen Heilung aus, so dass ein Absterben der Motoneurone die Folge wäre. Für diese Gruppe von Patienten würde eine verbesserte und somit schnellere Nervenregeneration für den weiteren Krankheitsverlauf von entscheidender Bedeutung sein. Dies würde zu weniger Fällen irreversibler Paresen führen und aufwendige Ersatzoperationen durch Muskeltransfer verringern oder sogar vermeiden.

In klinischen Gentherapiestudien stellt der Einsatz viraler Vektoren zur Einschleusung von Gensequenzen in eukaryonte Zellen mit einem Anteil von etwa 70% das meistverwendete System dar. Hierbei werden überwiegend Adenoviren als Vektoren eingesetzt. Hauptindikation ist die Therapie von Krebserkrankung (66,5%), gefolgt von der Therapie kardiovaskulärer (9,1%) und monogener (8,3%) Erkrankungen.<sup>38</sup> Der Einsatz von AdVEGF in klinischen Studien beschränkt sich bis heute primär auf die angiogenetischen Eigenschaften von VEGF zur Therapie kardiovaskulärer Krankheiten. Die Dauer der Genexpression ist dabei nicht über einen langen Zeitraum hinweg erforderlich, da der therapeutische Effekt durch eine



vorübergehende Expression von Wachstumsfaktoren erzielt wird.<sup>132</sup> Eine Infektion mit Adenoviren führt zur Aktivierung der Komplementkaskade mit nachfolgender Immunantwort.<sup>64</sup> Die in klinischen Studien durchgeführten adenoviralen Gentransfers können bei den behandelten Patienten somit entsprechende Symptome hervorrufen. Der Zusammenhang zwischen Vektordosis und Zellschädigung lässt bei der Applikation von Adenoviren das Vorhandensein eines Schwellenwerts vermuten. Unterhalb dieses Werts werden keine oder nur leichte Symptome hervorgerufen. Eine geringe Dosissteigerung kann jedoch zu massiven Zellschädigungen führen.<sup>83</sup> Die Applikation eines adenoviralen Vektors in zu großen Mengen kann eine schlagartige und überschießende Immunantwort mit lebensbedrohlichen Komplikationen zur Folge haben.<sup>32</sup> So kam es bei einer im Jahre 1999 durchgeführten Phase-I Studie an der Universität von Pennsylvania im Rahmen eines adenoviralen Gentransfers zum Tod eines 18-jährigen Jungen mit Defekt der Ornithin-Transcarbamylase.<sup>77</sup> Bei diesem Jungen wurde mit  $3,8 \times 10^{13}$  Viruspartikeln die höchste applizierte Virusmenge aller Studienteilnehmer injiziert. Die Tatsache, dass eine nur unwesentlich geringere Virusmenge bei den anderen Teilnehmern nicht zu entsprechenden Infektionszeichen führte, lässt auf eine individuell unterschiedliche Reaktion auf den Vektor und einen nur schwer kontrollierbaren Schwellenwert schließen. Die Beteiligung des Komplementsystems an den beobachteten Nebenwirkungen in diesem Fall und in anderen adenoviralen Gentherapiestudien stellt ein wichtiges Thema zukünftiger Forschung dar.

Der in dieser Arbeit nachgewiesene Effekt von AdVEGF<sub>165</sub> auf die Nervenregeneration und einer damit verbundenen Reduktion des Absterbens von Motoneuronen, spricht für den entsprechenden Einsatz als ergänzende Therapie bei der geburtstraumatischen Plexusparese. Die durch den adenoviralen Gentransfer hervorgerufene Überexpression von VEGF<sub>165</sub> ist nur auf einen bestimmten Zeitraum limitiert. Im Rahmen der geburtstraumatischen Plexusparese wäre dieser gezielte und vorübergehende Anstoß der angiogenetischen und neuroprotektiven Kaskade wünschenswert. In den meisten klinischen Studien mit adenoviralen Vektoren wurden bisher nur milde Symptome nach Applikation beobachtet.<sup>122</sup> Dennoch scheint die komplexe Immunantwort des Organismus ein stets unbeherrschbares Problem in der adenoviralen Gentherapie darzustellen. Bis heute ist die

Pharmakokinetik adenoviraler Vektorsysteme nicht ausreichend geklärt. Eine bessere medikamentöse Kontrolle möglicher Reaktionen auf den viralen Vektor ist hier von besonderer Bedeutung.<sup>124</sup> Durch die Verwendung sogenannter „helper dependent“ (oder: „gutless“) Adenoviren, synthetische virale Vektoren, denen sämtliche viralen Gene fehlen, konnte eine geringere Toxizität des Vektorsystems erreicht werden.<sup>25</sup> Die aufwendige Herstellung dieser Adenoviren und die nach wie vor bestehende Immunreaktion auf die Proteine der Virushülle limitieren hierbei jedoch die Einsatzmöglichkeiten.

In Bezug auf die geburtstraumatische Parese des Plexus brachialis ergeben sich durch eine ergänzende Gentherapie mit AdVEGF<sub>165</sub> weitere Schwierigkeiten. Bei der Mehrheit der Betroffenen liegen nur leichte Dehnungsverletzungen vor, bei denen eine vollständige und spontane Rückbildung der Beschwerden zu erwarten ist.<sup>6</sup> Jedes Neugeborene mit Nachweis einer initial bestehenden geburtstraumatischen Plexusparese einer adenoviralen Gentherapie zuzuführen, wäre im Hinblick auf mögliche Nachteile durch unerwünschte Nebenwirkungen nicht zu rechtfertigen. Entscheidend für den möglichen Einsatz von AdVEGF<sub>165</sub> ist die Ausprägung der Verletzung. Nur solche Plexusschäden, die durch eine spontane Nervenregeneration nicht zu einer vollständigen Heilung führen würden, kämen hierfür in Frage. Die exakte Bestimmung der Ausprägung des Schadens und eine mögliche Vorhersage über das Ausmaß der spontanen Regeneration stellen dabei jedoch das größte Problem dar. Eine medizinisch vertretbare Selektion nur der Patienten vorzunehmen, die tatsächlich einen Vorteil durch die Therapie mit AdVEGF<sub>165</sub> haben würden, scheint unmöglich. Für jedes unnötig therapierte Kind wäre das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen zu groß. Des Weiteren muss dem kaum entwickelten Immunsystem Neugeborener im Hinblick auf eine Applikation adenoviraler Vektoren besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden. Bis heute ist die Gentherapie mit adenoviralen Vektoren beim neugeborenen Menschen unerforscht.

---

## 4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Der Einsatz von VEGF zur Behandlung peripherer Nervenschäden ist seit der Entdeckung eines Zusammenhangs zwischen Angiogenese und Neurogenese in den Vordergrund gerückt.<sup>111</sup> Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eine verbesserte Nervenregeneration unter dem Einfluss von VEGF, jedoch gaben sie keine Auskunft darüber, in welchem Verhältnis der angiogenetische und der neurotrophe Effekt von VEGF Anteil daran hatten. Die Bindung von VEGF an Neuropilin-Rezeptoren von Axonen fördert nachweislich deren Aussprossung nach einem Nervenschaden.<sup>112</sup> Gleichzeitig führt die durch VEGF induzierte Angiogenese zu einer adäquaten Blutversorgung im verletzten Gewebe, was im Hinblick auf die Regeneration ebenfalls unerlässlich ist.<sup>61</sup> Als Schlussfolgerung bleibt festzuhalten, dass eine positive Korrelation zwischen der VEGF-Konzentration im verletzten Gewebe und einer verbesserten Nervenregeneration existiert. VEGF hat einen unterstützenden Einfluss auf das Wachstum regenerierender Nervenfasern, wobei es sich am ehesten um eine Kombination von angiogenetischen, neurotrophen und neuroprotektiven Effekten handelt.

Eine verbesserte Nervenregeneration kann in vielen Bereichen der Plastischen Chirurgie von Bedeutung sein. Neben der geburtstraumatischen Parese des Plexus brachialis und sonstigen peripheren Nervenverletzungen, ist diese auch bei elektiven Operationen im Rahmen von Lappenplastiken wünschenswert. In diesem Zusammenhang spielt eine adäquate Nervenregeneration nicht nur für den verwendeten Muskel, sondern auch für das Haut- und Fettgewebe eine wichtige Rolle.<sup>10</sup> Durch den Einsatz von AdVEGF kann eine verbesserte Nervenregeneration selbst nach Durchtrennung von größeren Nerven erreicht werden.<sup>94</sup> Dies wäre bei der operativen Rekonstruktion des Plexus brachialis mit Verwendung von Nerventransplantaten von Bedeutung.

Die hohe Rate an spontanen und vollständigen Rückbildungen der Symptome bei Patienten mit geburtstraumatischer Plexusparese lässt die obligatorische Durchführung einer risikobehafteten Therapie mit AdVEGF als nicht sinnvoll erscheinen. Als wichtige Voraussetzung für eine solche Therapie stellt die Risiko-

Nutzen-Abwägung dar. Die bekannten Risiken und Nachteile der Therapie müssen in einem angemessenen Verhältnis gegenüber dem zu erwartenden Nutzen für den Betroffenen stehen. Im Fall der geburtstraumatischen Plexusparese stünden dem Nutzen in Form einer möglichen Verhinderung irreversibler Paresen die unter Umständen lebensbedrohlichen Komplikationen der adenoviralen Gentherapie gegenüber. Bis heute existieren keine Ergebnisse einer entsprechenden Therapie beim Neugeborenen, bei denen der Einsatz viraler Vektoren im Hinblick auf das kaum entwickelte Immunsystem ohnehin bedenklich erscheint. Die Anwendung einer adenoviralen Gentherapie bei Kindern scheint ethisch nur im Rahmen letal verlaufender Gendefekte vertretbar, wenn die entsprechende Therapie erfolgsversprechend ist und herkömmliche Therapieverfahren versagen. Bei immunkompetenten Erwachsenen jedoch könnte der Einsatz von AdVEGF zur gentherapeutischen Präkonditionierung bei elektiven Lappenplastiken von Relevanz sein.

Die Verwendung viraler Vektoren in klinischen Gentherapiestudien ist im Bereich neurologischer Erkrankungen mit einem Anteil von nur 1,5% bis heute nicht ausreichend erforscht.<sup>38</sup> Im Bereich der Plastischen Chirurgie ist die Therapie mit AdVEGF ebenfalls unerprobt. Den möglichen Vorteilen der Therapie stehen die nach wie vor unbeherrschbaren Nebenwirkungen der Vektorsysteme entgegen. So bleibt die Entwicklung verbesserter und weniger toxischer Vektoren abzuwarten. Durch die Risiko-Nutzen-Abwägung kann der obligatorische Einsatz von AdVEGF bei einer initial bestehenden geburtstraumatischen Plexusparese nicht gerechtfertigt werden. Voraussetzung für die Einführung von AdVEGF in den klinischen Alltag ist ein besseres Verständnis über die Pharmakokinetik adenoviraler Vektorsysteme sowie die Reduktion systemischer Wirkungen. Des Weiteren müsste eine verbesserte Vorhersage über das Potential einer spontanen und vollständigen Nervenregeneration eines jeden Betroffenen möglich sein, um die Behandlung auf die Patienten beschränken zu können, die tatsächlich von der Therapie profitieren.

---

## 5. Zusammenfassung

Kürzlich konnte in Untersuchungen zur geburtstraumatischen Parese des Plexus brachialis neben dem Schaden am Plexus brachialis selbst ein zusätzlicher Verlust von Motoneuronen im zugehörigen Rückenmarksegment festgestellt werden. Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) besitzt eine zentrale Stellung im Prozess der Angiogenese. Darüber hinaus wurde in neueren Studien ein positiver Effekt auf die Regeneration und das Überleben von Nervenzellen nachgewiesen. Vor diesem Hintergrund soll der Zusammenhang einer Gentherapie mit VEGF und einer verbesserten Nervenregeneration im Hinblick auf die geburtstraumatische Plexusparese untersucht werden.

Innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt erfolgte im Tiermodell an der Ratte (n=18) eine Operation mit Quetschtrauma der Nervenwurzeln C5 und C6 des linken Plexus brachialis. Die Tiere aus der Versuchsgruppe (n=9) erhielten im Anschluss eine Injektion mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> in das den Schaden umgebende Gewebe. Die Kontrollgruppe (n=9) hingegen erhielt eine Injektion mit NaCl 0,9% in äquivalenter Menge in entsprechendes Gewebe. Nach drei Wochen erfolgten in einem Zeitraum von 11 Wochen Verhaltensuntersuchungen, die eine Beurteilung über den Verlauf der Regeneration auf funktioneller Ebene ermöglichen. Nach Euthanasie der Ratten im 10. Lebensmonat wurde der M. deltoideus und der Plexus brachialis beidseits sowie das Rückenmark entnommen. Es folgte die Gewichtsbestimmung des M. deltoideus im Seitenvergleich, wodurch das Ausmaß der Muskelatrophie im Rahmen der Plexusparese bestimmt werden konnte. Anschließend wurde das Muskelgewebe sowie das Nervengewebe des Plexus brachialis mikroskopisch nach festgelegten Kriterien auf Degeneration untersucht. Zusätzlich wurde durch ein Enzyme-linked-Immunosorbent Assay (ELISA) die VEGF-Expression im Plexus brachialis quantifiziert. Nach Färbung der Motoneurone im Rückenmark mit Anti-CGRP Antikörpern wurden diese seitenvergleichend im Vorderhorn eines vom Schaden betroffenen Segments mikroskopisch ausfindig gemacht und gezählt.

Die Therapie mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> führte im Vergleich zur Behandlung mit NaCl 0,9% zu einer fast 90% höheren VEGF-Konzentration im behandelten Gewebe. Auf funktioneller Ebene ließen sich ausgeprägtere Defizite in der Kontrollgruppe feststellen. Die Gewichtsbestimmung des M. deltoideus der operierten Seite zeigte eine geringere Reduzierung der Muskelmasse in der Versuchsgruppe. Durch die histologische Untersuchung des M. deltoideus konnte eine stärker ausgeprägte Degeneration der operierten Seite in der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die histologische Untersuchung des Plexus brachialis der operierten Seite zeigte eine signifikant geringer ausgeprägte Nervendegeneration in der Versuchsgruppe ( $p < 0,05$ ). Die Zählung der  $\alpha$ -Motoneurone im Rückenmark erbrachte eine signifikant größere Anzahl überlebender Motoneurone in der Versuchsgruppe ( $p < 0,05$ ).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigten den positiven Effekt von VEGF auf die Regeneration und das Überleben von Nervenzellen. Der klinische Einsatz von AdVEGF im Rahmen der geburtstraumatischen Parese des Plexus brachialis beim Neugeborenen kann bislang nicht gerechtfertigt werden. Die Erkenntnisse über den positiven Einfluss von VEGF auf Nervenzellen eröffnen jedoch neue Möglichkeiten in der Behandlung neurologischer Krankheiten und stellen einen wichtigen Ansatz für die zukünftige Forschung in der Plastischen Chirurgie dar.

---

## 6. Literaturverzeichnis

1. Al-Qattan MM. Elbow flexion reconstruction by Steindler flexorplasty in obstetric brachial plexus palsy. *J Hand Surg Br* 2005;30:424-7.
2. Al-Qattan MM, Clarke HM, Curtis CG. Klumpke's birth palsy. Does it really exist? *J Hand Surg Br* 1995;20:19-23.
3. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995;1:1024-8.
4. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* 1998;101:40-50.
5. Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, et al. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* 2004;429:413-7.
6. Bager B. Perinatally acquired brachial plexus palsy--a persisting challenge. *Acta Paediatr* 1997;86:1214-9.
7. Bahm J. [Obstetric brachial plexus palsy--clinics, pathophysiology and surgical treatment]. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefässe : Organ der Vereinigung der Deutschen Plastischen Chirurgen* 2003;35:83-97.
8. Baliarsing AS, Doi K, Hattori Y. Bilateral elbow flexion reconstruction with functioning free muscle transfer for obstetric brachial plexus palsy. *J Hand Surg Br* 2002;27:484-6.
9. Barbeau D, Charbonneau R, Whalen SG, Bayley ST, Branton PE. Functional interactions within adenovirus E1A protein complexes. *Oncogene* 1994;9:359-73.
10. Bayramicli M, Jackson IT, Herschman B. Innervation of skin grafts over free muscle flaps. *Br J Plast Surg* 2000;53:130-6.

11. Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, et al. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res* 2000;86:E29-35.
12. Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10:440-7.
13. Bertelli JA. Brachialis muscle transfer to the forearm muscles in obstetric brachial plexus palsy. *J Hand Surg Br* 2006;31:261-5.
14. Bertelli JA. Lengthening of subscapularis and transfer of the lower trapezius in the correction of recurrent internal rotation contracture following obstetric brachial plexus palsy. *J Bone Joint Surg Br* 2009;91:943-8.
15. Bertelli JA, Ghizoni MF, Tacca CP. Transfer of the supinator muscle to the extensor pollicis brevis for thumb extension reconstruction in C7-T1 brachial plexus palsy. *J Hand Surg Eur Vol* 2010;35:29-31.
16. Bertelli JA, Mira JC. Behavioral evaluating methods in the objective clinical assessment of motor function after experimental brachial plexus reconstruction in the rat. *J Neurosci Methods* 1993;46:203-8.
17. Bertelli JA, Mira JC. The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. *J Neurosci Methods* 1995;58:151-5.
18. Birch R. Obstetric brachial plexus palsy. *J Hand Surg Br* 2002;27:3-8.
19. Birch R, Ahad N, Kono H, Smith S. Repair of obstetric brachial plexus palsy: results in 100 children. *J Bone Joint Surg Br* 2005;87:1089-95.
20. Boyd JG, Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol Neurobiol* 2003;27:277-324.
21. Brand PW. Biomechanics of tendon transfers. *Hand Clin* 1988;4:137-54.
22. Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, et al. Nerve crush injuries--a model for axonotmesis. *Exp Neurol* 1994;127:284-90.
23. Brigham KL, Meyrick B, Christman B, Berry LC, Jr., King G. Expression of a prokaryotic gene in cultured lung endothelial cells after lipofection with a plasmid vector. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989;1:95-100.
24. Bunnell S. Restoring flexion to the paralytic elbow. *J Bone Joint Surg Am* 1951;33-A:566-71: passim.



- 
25. Burroughs KD, Kayda DB, Sakhuja K, et al. Potentiation of oncolytic adenoviral vector efficacy with gutless vectors encoding GMCSF or TRAIL. *Cancer Gene Ther* 2004;11:92-102.
  26. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003;9:653-60.
  27. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389-95.
  28. Chen L, Gu YD, Wang H. Microsurgical reconstruction of obstetric brachial plexus palsy. *Microsurgery* 2008;28:108-12.
  29. Chen ZL, Yu WM, Strickland S. Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci* 2007;30:209-33.
  30. Chuah MK, Collen D, VandenDriessche T. Biosafety of adenoviral vectors. *Curr Gene Ther* 2003;3:527-43.
  31. Chuang DC, Mardini S, Ma HS. Surgical strategy for infant obstetrical brachial plexus palsy: experiences at Chang Gung Memorial Hospital. *Plast Reconstr Surg* 2005;116:132-42; discussion 43-4.
  32. Cichon G, Boeckh-Herwig S, Schmidt HH, et al. Complement activation by recombinant adenoviruses. *Gene Ther* 2001;8:1794-800.
  33. Clark JM. Reconstruction of biceps brachii by pectoral muscle transplantation. *Br J Surg* 1946;34:180.
  34. Clarke HM, Curtis CG. An approach to obstetrical brachial plexus injuries. *Hand Clin* 1995;11:563-80; discussion 80-1.
  35. Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:806-19.
  36. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996;87:1161-9.
  37. Dor Y, Porat R, Keshet E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C1367-74.
  38. Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. *J Gene Med* 2007;9:833-42.

39. Felgner PL, Barenholz Y, Behr JP, et al. Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum Gene Ther* 1997;8:511-2.
40. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:7413-7.
41. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4-25.
42. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.
43. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-8.
44. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002;29:15-8.
45. Freedman SB, Vale P, Kalka C, et al. Plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) levels after intramuscular and intramyocardial gene transfer of VEGF-1 plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 2002;13:1595-603.
46. Fu C, Hong G, Wang F. Favorable effect of local VEGF gene injection on axonal regeneration in the rat sciatic nerve. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2007;27:186-9.
47. Galzie Z, Kinsella AR, Smith JA. Fibroblast growth factors and their receptors. *Biochem Cell Biol* 1997;75:669-85.
48. Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 1997;272:23659-67.
49. Gilbert A, Pivato G, Kheiralla T. Long-term results of primary repair of brachial plexus lesions in children. *Microsurgery* 2006;26:334-42.
50. Gilbert A, Tassin JL. [Surgical repair of the brachial plexus in obstetric paralysis]. *Chirurgie* 1984;110:70-5.
51. Giunta R. Geburtstraumatische Armplexusparese - Chancen einer frühzeitigen Operation. *Pädiatrische Praxis* 2006;68:181-92.
52. Giunta RE, Holzbach T, Taskov C, et al. AdVEGF165 gene transfer increases survival in overdimensioned skin flaps. *J Gene Med* 2005;7:297-306.

- 
53. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977;36:59-74.
  54. Greenwald AG, Schute PC, Shiveley JL. Brachial plexus birth palsy: a 10-year report on the incidence and prognosis. *J Pediatr Orthop* 1984;4:689-92.
  55. Gu YD, Chen L, Shen LY. Classification of impairment of shoulder abduction in obstetric brachial plexus palsy and its clinical significance. *J Hand Surg Br* 2000;25:46-8.
  56. Hadaczek P, Mirek H, Berger MS, Bankiewicz K. Limited efficacy of gene transfer in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir gene therapy for brain tumors. *J Neurosurg* 2005;102:328-35.
  57. Hayward PG, Alison WE, Jr., Carp SS, Hui PS, Robson MC. Local infiltration of an angiogenic growth factor does not stimulate the delay phenomenon. *Br J Plast Surg* 1991;44:526-9.
  58. Hedman M, Hartikainen J, Syvanne M, et al. Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation* 2003;107:2677-83.
  59. Heise CO, Lorenzetti L, Marchese AJ, Gherpelli JL. Motor conduction studies for prognostic assessment of obstetrical plexopathy. *Muscle Nerve* 2004;30:451-5.
  60. Henry TD, Annex BH, McKendall GR, et al. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 2003;107:1359-65.
  61. Hobson MI, Green CJ, Terenghi G. VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy. *J Anat* 2000;197 Pt 4:591-605.
  62. Kootstra NA, Verma IM. Gene therapy with viral vectors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003;43:413-39.
  63. Korak KJ, Tam SL, Gordon T, Frey M, Aszmann OC. Changes in spinal cord architecture after brachial plexus injury in the newborn. *Brain* 2004;127:1488-95.
  64. Kovesdi I, Brough DE, Bruder JT, Wickham TJ. Adenoviral vectors for gene transfer. *Curr Opin Biotechnol* 1997;8:583-9.
  65. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, et al. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 1996;122:3829-37.

66. Lagerkvist AL, Johansson U, Johansson A, Bager B, Uvebrant P. Obstetric brachial plexus palsy: a prospective, population-based study of incidence, recovery, and residual impairment at 18 months of age. *Dev Med Child Neurol* 2010;52:529-34.
67. Laham RJ, Simons M, Sellke F. Gene transfer for angiogenesis in coronary artery disease. *Annu Rev Med* 2001;52:485-502.
68. Laitinen M, Pakkanen T, Donetti E, et al. Gene transfer into the carotid artery using an adventitial collar: comparison of the effectiveness of the plasmid-liposome complexes, retroviruses, pseudotyped retroviruses, and adenoviruses. *Hum Gene Ther* 1997;8:1645-50.
69. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, et al. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet* 2003;34:383-94.
70. Lewis T, Pickering GW, Tothschild P. Centripetal paralysis arising out of arrested bloodflow to the limb. *Heart* 1931:1-32.
71. Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 1997;277:242-5.
72. Liu ST, Huang SJ, Chu YH, Wong CS, Wu CT, Ho ST. Brachial plexus injury during surgery--report of two cases. *Acta Anaesthesiol Sin* 1997;35:181-5.
73. Lowrie MB, Vrbova G. Dependence of postnatal motoneurons on their targets: review and hypothesis. *Trends Neurosci* 1992;15:80-4.
74. Lundstrom K. Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol* 2003;21:117-22.
75. Lykissas MG, Batistatou AK, Charalabopoulos KA, Beris AE. The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration. *Curr Neurovasc Res* 2007;4:143-51.
76. Makinen K, Manninen H, Hedman M, et al. Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol Ther* 2002;6:127-33.
77. Marshall E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 1999;286:2244-5.
78. Metz GA, Merkler D, Dietz V, Schwab ME, Fouad K. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Res* 2000;883:165-77.

- 
79. Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, et al. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *Embo J* 1999;18:363-74.
  80. Michalski B, Bain JR, Fahnstock M. Long-term changes in neurotrophic factor expression in distal nerve stump following denervation and reinnervation with motor or sensory nerve. *J Neurochem* 2008;105:1244-52.
  81. Mollberg M, Hagberg H, Bager B, Lilja H, Ladfors L. High birthweight and shoulder dystocia: the strongest risk factors for obstetrical brachial plexus palsy in a Swedish population-based study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005;84:654-9.
  82. Mollberg M, Hagberg H, Bager B, Lilja H, Ladfors L. Risk factors for obstetric brachial plexus palsy among neonates delivered by vacuum extraction. *Obstet Gynecol* 2005;106:913-8.
  83. Morral N, O'Neal WK, Rice K, et al. Lethal toxicity, severe endothelial injury, and a threshold effect with high doses of an adenoviral vector in baboons. *Hum Gene Ther* 2002;13:143-54.
  84. Muhlhauser J, Merrill MJ, Pili R, et al. VEGF165 expressed by a replication-deficient recombinant adenovirus vector induces angiogenesis in vivo. *Circ Res* 1995;77:1077-86.
  85. Mymryk JS, Bayley ST. Multiple pathways for activation of E2A expression in human KB cells by the 243R E1A protein of adenovirus type 5. *Virus Res* 1994;33:89-97.
  86. Nabel EG, Shum L, Pompili VJ, et al. Direct transfer of transforming growth factor beta 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:10759-63.
  87. Ny A, Koch M, Vandeveld W, et al. Role of VEGF-D and VEGFR-3 in developmental lymphangiogenesis, a chemicogenetic study in *Xenopus* tadpoles. *Blood* 2008;112:1740-9.
  88. Ochoa J, Danta G, Fowler TJ, Gilliatt RW. Nature of the nerve lesion caused by a pneumatic tourniquet. *Nature* 1971;233:265-6.
  89. Olson L, Backman L, Ebendal T, et al. Role of growth factors in degeneration and regeneration in the central nervous system; clinical experiences with NGF in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neurol* 1994;242:S12-5.
  90. Oosthuyse B, Moons L, Storkebaum E, et al. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 2001;28:131-8.

91. Oshima Y, Deering T, Oshima S, et al. Angiopoietin-2 enhances retinal vessel sensitivity to vascular endothelial growth factor. *J Cell Physiol* 2004;199:412-7.
92. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993;4:1317-26.
93. Pearl ML, Edgerton BW, Kazimiroff PA, Burchette RJ, Wong K. Arthroscopic release and latissimus dorsi transfer for shoulder internal rotation contractures and glenohumeral deformity secondary to brachial plexus birth palsy. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88:564-74.
94. Pereira Lopes FR, Lisboa BC, Frattini F, et al. Enhancement of sciatic nerve regeneration after vascular endothelial growth factor (VEGF) gene therapy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011;37:600-12.
95. Pereira Lopes FR, Lisboa BC, Frattini F, et al. Enhancement of sciatic-nerve regeneration after VEGF gene therapy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011.
96. Pondaag W, de Boer R, van Wijlen-Hempel MS, Hofstede-Buitenhuis SM, Malessy MJ. External rotation as a result of suprascapular nerve neurotization in obstetric brachial plexus lesions. *Neurosurgery* 2005;57:530-7; discussion -7.
97. Rajagopalan S, Mohler ER, 3rd, Lederman RJ, et al. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation* 2003;108:1933-8.
98. Rasmussen HS, Rasmussen CS, Macko J. VEGF gene therapy for coronary artery disease and peripheral vascular disease. *Cardiovasc Radiat Med* 2002;3:114-7.
99. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993;362:59-62.
100. Rouse DJ, Owen J, Goldenberg RL, Cliver SP. The effectiveness and costs of elective cesarean delivery for fetal macrosomia diagnosed by ultrasound. *Jama* 1996;276:1480-6.
101. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953;84:570-3.
102. Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 2001;344:1688-700.

- 
103. Saha AK. Surgery of the paralysed and flail shoulder. *Acta Orthop Scand* 1967;Suppl 97:5-0.
  104. Sakurai Y, Ohgimoto K, Kataoka Y, Yoshida N, Shibuya M. Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:1076-81.
  105. Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1143-51.
  106. Schenck TL, Bayer T, Enders A, et al. [Splints in birth-related brachial plexus injuries]. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefässe : Organ der Vereinigung der Deutschen Plastischen Chirurgen* 2011;43:105-11.
  107. Schmalbruch H. Motoneuron death after sciatic nerve section in newborn rats. *J Comp Neurol* 1984;224:252-8.
  108. Seddon H. *Surgical disorders of the peripheral nerves*. Churchill Livingstone, Edinburgh 1975.
  109. Siemionow M, Sari A. A contemporary overview of peripheral nerve research from the Cleveland Clinic microsurgery laboratory. *Neurol Res* 2004;26:218-25.
  110. Soker S, Fidler H, Neufeld G, Klagsbrun M. Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain. *J Biol Chem* 1996;271:5761-7.
  111. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998;92:735-45.
  112. Sondell M, Sundler F, Kanje M. Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. *Eur J Neurosci* 2000;12:4243-54.
  113. Songcharoen P. Brachial plexus injury in Thailand: a report of 520 cases. *Microsurgery* 1995;16:35-9.
  114. Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays* 2004;26:943-54.

115. Storkebaum E, Lambrechts D, Dewerchin M, et al. Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci* 2005;8:85-92.
116. Sunderland S. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle Nerve* 1990;13:771-84.
117. Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain* 1951;74:491-516.
118. Taipale J, Makinen T, Arighi E, Kukk E, Karkkainen M, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor receptor-3. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:85-96.
119. Tarkka T, Sipola A, Jamsa T, et al. Adenoviral VEGF-A gene transfer induces angiogenesis and promotes bone formation in healing osseous tissues. *J Gene Med* 2003;5:560-6.
120. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat* 1999;194 ( Pt 1):1-14.
121. Terzis JK, Papakonstantinou KC. Management of obstetric brachial plexus palsy. *Hand Clin* 1999;15:717-36.
122. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 2003;4:346-58.
123. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991;266:11947-54.
124. Tomanin R, Scarpa M. Why do we need new gene therapy viral vectors? Characteristics, limitations and future perspectives of viral vector transduction. *Curr Gene Ther* 2004;4:357-72.
125. Van Den Bosch L, Storkebaum E, Vleminckx V, et al. Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) on motor neuron degeneration. *Neurobiol Dis* 2004;17:21-8.
126. VandenDriessche T, Collen D, Chuah MK. Biosafety of onco-retroviral vectors. *Curr Gene Ther* 2003;3:501-15.
127. Verma IM, Somia N. Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* 1997;389:239-42.



- 
128. Vredevelde JW, Blaauw G, Slooff BA, Richards R, Rozeman SC. The findings in paediatric obstetric brachial palsy differ from those in older patients: a suggested explanation. *Dev Med Child Neurol* 2000;42:158-61.
  129. Wold WS, Gooding LR. Region E3 of adenovirus: a cassette of genes involved in host immunosurveillance and virus-cell interactions. *Virology* 1991;184:1-8.
  130. Wongtrakul S, Bishop AT, Friedrich PF. Vascular endothelial growth factor promotion of neoangiogenesis in conventional nerve grafts. *J Hand Surg Am* 2002;27:277-85.
  131. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407:242-8.
  132. Yla-Herttuala S, Alitalo K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med* 2003;9:694-701.
  133. Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1015-26.
  134. Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000;407:802-9.
  135. Zancolli EA. Paralytic supination contracture of the forearm. *J Bone Joint Surg Am* 1967;49:1275-84.
  136. Zancolli EA, Zancolli ER, Jr. Palliative surgical procedures in sequelae of obstetric palsy. *Hand Clin* 1988;4:643-69.

## 7. Anhang

### 7.1 Chemikalien und Puffer

- Citronensäure,  $C_6H_8O_7$  (Fa. Merck, Darmstadt)
- Diaminobenzidin, DAB (Fa. Carl Roth, Karlsruhe)
- Dinatriumhydrogenphosphat,  $Na_2HPO_4$  (Fa. Merck, Darmstadt)
- Eosinlösung 1% (Fa. Merck, Darmstadt)
- Ethanol, absolut (Fa. Merck, Darmstadt)
- Formaldehyd (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Hämaunlösung (Fa. Merck, Darmstadt)
- Isopropanol 100% (Fa. Serva, Heidelberg)
- Kaliumchlorid, KCl (Fa. Merck, Darmstadt)
- Kaliumdihydrogenphosphat,  $KH_2PO_4$  (Fa. AppliChem, Darmstadt)
- Natriumchlorid, NaCl 0,9% (Fa. Merck, Darmstadt)
- Tri-Natriumcitrat-Dihydrat,  $C_6H_5Na_3O_7$  (Fa. Carl Roth, Karlsruhe)
- Wasserstoffperoxid,  $H_2O_2$  30% (Fa. Merck, Darmstadt)
- Xylol (Fa. Merck, Darmstadt)
  
- Citrat-Puffer:
  - 3,78 g       $C_6H_8O_7$
  - 24,21 g      $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$
  
- PBS:
  - 8,18 g      NaCl
  - 1,77 g       $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$
  - 0,2 g       KCl
  - 0,24 g       $KH_2PO_4$

---

## 7.2 Antikörper und Reagenz-Kits

- CGRP-Antikörper (Fa. Abcam, Cambridge, UK)
- Reporterenzym-Färbesystem (ImmPRESS™ Peroxidase Polymer Detection Reagent Kit, Fa. Vector, Burlingame, USA)
- VEGF ELISA Kit (Fa. RayBiotech, Norcross, USA)

## 7.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Abzug (Captair, Fa. Erlab, Köln)
- Brutschränke (Fa. Life Sciences International, Frankfurt)
- Densitometer (Biolumin 960 Microplate Reader, Fa. Molecular Dynamics, Tokyo, Japan)
- Einbettkassetten (Fa. Carl Roth, Karlsruhe)
- Einmalrasierer (Fa. Dahlhausen, Köln)
- Eismaschine (Fa. Ziegra, Isernhagen)
- Eppendorf-Reaktionsgefäße (Typ 3810X, Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Gefrierschrank -80°C (Hera freeze, Fa. Heraeus Holding, Hanau)
- Gewinde-Reagenzgläser (Fa. Schott, Mainz)
- Handschuhe steril (Sempermed, Fa. Lohmann & Rauscher, Neuwied)
- Kanülen 36G (Microlance™, Fa. Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden)
- Kühlschrank 6°C (Fa. Liebherr, Biberach an der Riss)
- Laboruhr (Fa. Oregon Scientific, Villingen)
- Magnetrührer (Variomag®, Fa. H+P Labortechnik, München)
- Mikropinzette (Fa. Aesculap, Tuttlingen)
- Mikropipetten (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Mikroskop (Axio Scope, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen)
- Mikrowellenofen (Fa. Siemens, München)
- Objektträger 26 x 76 mm (Fa. Menzel, Braunschweig)
- Orbitalschüttler (Duomax® 2030, Fa. Heidolph Instruments, Schwabach)
- Photokamera, digital (Optio® S, Pentax Corp., Tokyo, Japan)
- Prolene® 6-0 (Fa. Ethicon Products, Norderstedt)

- Rasierklingen (Typ 8812 Single Edge Razor Blade, Fa. ATD Tools, Wentzville, USA)
- Rotationsmikrotom, halbautomatisch (Jung RM2055, Fa. Leica, Wetzlar)
- Seitenschneider (Durotip, Fa. Aesculap, Tuttlingen)
- Skalpellklingen Nr. 15 (Fa. Aesculap, Tuttlingen)
- Spritzen (Fa. Codan medical, Rødby, Denmark)
- Surgical Skin Marker (Securline<sup>®</sup>, Fa. Precision Dynamics, San Fernando, USA)
- Waage (Modell MC1 RC210P, Fa. Sartorius, Göttingen)
- Wasserbad (Fa. Memmert, Schwabach)
- Zentrifuge (Fast Prep<sup>®</sup> FP 120 cell disrupter, Fa. Qbiogene, Carlsbad, USA)
- Zirconia/Silica Perlen (Fa. BioSpec, Bartlesville, USA)

#### 7.4 Pharmaka und Tiernahrung

- Atipamezol (Antisedan<sup>®</sup>, Orion Corporation, Espoo, Finnland)
- Isofluran (Attane<sup>™</sup> Isoflurane, Provet AG, Lyssach, Schweiz)
- Ketamin (Narketan<sup>®</sup>, Chassot GmbH, Ravensburg)
- Medetomidin (Domitor<sup>®</sup>, Orion Corporation, Espoo, Finnland)
- Midazolam (Dormicum<sup>®</sup>, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen)
- Rattenpellets 1320 (Altromin GmbH, Lage)
- Xylazin (Rompun<sup>®</sup>, Bayer, Leverkusen)

#### 7.5 Software

- MikroWin 2000 Software (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath)
- IBM SPSS Statistics (Version 21, IBM, Armonk, USA)

---

## 8. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** (S. 10): Aufbau des Plexus brachialis (modifiziert nach Carter 1858)
- Abb. 2** (S. 11): Aufbau eines peripheren Nervs im Querschnitt (modifiziert nach Lundborg 1988)
- Abb. 3** (S. 15): Schulterdystokie durch Größenmissverhältnisse zwischen Geburtskanal, Kopf und Schultergürtel des Kindes. Geburtstraumatische Verletzung des Plexus brachialis durch starken Zug am Kopf des Kindes möglich (Monatsschrift Kinderheilkunde 2010, 158: S. 264)
- Abb. 4** (S. 16): a) 15-jähriges Mädchen mit Erb-Lähmung links. Deutliche Verkürzung der linken oberen Extremität mit Innenrotationskontraktur und b) eingeschränkter Abduktion (Monatsschrift Kinderheilkunde 2010, 158: S. 265)
- Abb. 5** (S. 29): Rezeptorinteraktionen von VEGF (modifiziert nach Hicklin 2005)
- Abb. 6** (S. 35): a) Lipoplex und b) rekombinantes Plasmid als Vektoren zum Gentransfer
- Abb. 7** (S. 36): a) Infektion eines replikationskompetenten Virus in seine Wirtszelle und b) Infektion eines rekombinanten und replikationsdefizienten Virus in seine Wirtszelle. 1: Eindringen des Virus in die Zelle und Replikation seiner DNA im Zellkern. 2: Nach Transkription der DNA verlässt die mRNA den Zellkern. 3: a) Translation der mRNA mit Bildung viraler Bestandteile. b) Translation der mRNA mit Bildung des vom Transgen kodierten Proteins. 4: a) Die synthetisierten Viren verlassen die Zelle und infizieren weitere Zellen. b) Sekretion der synthetisierten Proteine.
- Abb. 8** (S. 45): Neugeborenes
- Abb. 9** (S. 45): Plexusdarstellung (Sektionspräparat)
- Abb. 10** (S. 45): Wundverschluss
- Abb. 11** (S. 49): Schematische Darstellung der Bewegungsmuster

- Abb. 12** (S. 61): a) Inkubation der Zellen mit Anti-CGRP Antikörpern und Bindung dieser an CGRP b) Zugabe der Enzym-konjugierten Universal Anti-Kaninchen Antikörper und Bindung dieser an die Anti-CGRP Antikörper c) Zugabe von DAB und Bindung dieses an die Peroxidasen, die an die Universal Anti-Kaninchen Antikörper konjugiert sind. Durch Oxidation von DAB durch die Peroxidasen kommt es zu einem braunen Farbumschlag.
- Abb. 13** (S. 62): Färbung der Motoneurone im Vorderhorn mit Anti-CGRP Antikörpern
- Abb. 14** (S. 65): Mittelwert der Fehlritte der Behandlungsgruppen pro Versuchswoche
- Abb. 15** (S. 66): Anzahl der Fehlritte pro Versuchswoche im Gruppenvergleich
- Abb. 16** (S. 67): Mittelwert der maximalen Kraft (g) der Behandlungsgruppen pro Versuchswoche
- Abb. 17** (S. 68): Maximale Kraft (g) der Versuchsgruppe pro Versuchswoche im Seitenvergleich
- Abb. 18** (S. 69): Maximale Kraft (g) der Kontrollgruppe pro Versuchswoche im Seitenvergleich
- Abb. 19** (S. 70): Maximale Kraft (g) der operierten linken Seite pro Versuchswoche im Gruppenvergleich
- Abb. 20** (S. 71): Mittelwert des Bewegungsausmaßes (Grad) der Behandlungsgruppen pro Versuchswoche (nur linke Seite dargestellt)
- Abb. 21** (S. 72): Bewegungsausmaß (Grad) der operierten linken Seite pro Versuchswoche im Gruppenvergleich
- Abb. 22** (S. 73): Summe der Gewichtsmasse (g) aller Tiere im Seitenvergleich
- Abb. 23** (S. 73): Summe der Gewichtsmasse (g) aller Tiere im Seitenvergleich
- Abb. 24** (S. 75): Differenzen des Muskelgewichts (g) im Gruppenvergleich
- Abb. 25** (S. 77): Reduzierte Muskelfaserdichte
- Abb. 26** (S. 77): Ausgeprägte Muskelfaserdichte
- Abb. 27** (S. 77): Mikrofaszikelbildung
- Abb. 28** (S. 77): Ausgeprägte perimysiale Fibrose
- Abb. 29** (S. 77): Fettgewebsbildung

- 
- Abb. 30** (S. 77): Entzündungsreaktion
- Abb. 31** (S. 79): Ergebnisse der histologischen Untersuchung der rechten Seite im Gruppenvergleich
- Abb. 32** (S. 81): Ergebnisse der histologischen Untersuchung der linken Seite im Gruppenvergleich
- Abb. 33** (S. 83): Reduzierte Nervenfaserdichte
- Abb. 34** (S. 83): Ausgeprägte Nervenfaserdichte
- Abb. 35** (S. 83): Ausgeprägte Gefäßdichte
- Abb. 36** (S. 83): Auftreten von Vakuolen
- Abb. 37** (S. 83): Ausgeprägte epineurale Fibrose
- Abb. 38** (S. 83): Entzündungsreaktion
- Abb. 39** (S. 85): Ergebnisse der histologischen Untersuchung der rechten Seite im Gruppenvergleich
- Abb. 40** (S. 87): Ergebnisse der histologischen Untersuchung der linken Seite im Gruppenvergleich
- Abb. 41** (S. 92): Rechte Seite eines Tieres aus der Versuchsgruppe mit 36 Motoneuronen
- Abb. 42** (S. 92): Linke Seite des Tieres aus Abb. 39 mit 34 Motoneuronen, Differenz: 2
- Abb. 43** (S. 92): Rechte Seite eines Tieres aus der Kontrollgruppe mit 52 Motoneuronen
- Abb. 44** (S. 92): Linke Seite des Tieres aus Abb. 41 mit 41 Motoneuronen, Differenz: 11
- Abb. 45** (S. 94): Differenzen der Anzahl der Motoneurone im Gruppenvergleich

## 9. Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1</b> (S. 12):	Klassifikation und Pathologie der Verletzungen peripherer Nerven nach Seddon und Sunderland
<b>Tab. 2</b> (S. 49):	Wertesystem zur Beurteilung des Bewegungsmusters im Grooming-Test
<b>Tab. 3</b> (S. 51):	Ablauf der Alkoholreihe
<b>Tab. 4</b> (S. 52):	Ablauf der Hämatoxylin-Eosin-Färbung
<b>Tab. 5</b> (S. 53):	Ausprägung der Kriterien in Grade
<b>Tab. 6</b> (S. 55):	Ausprägung der Kriterien in Grade
<b>Tab. 7</b> (S. 56):	Auflistung der entnommenen Plexuspräparate
<b>Tab. 8</b> (S. 60):	Herstellung des PBS-Puffers auf 1 Liter destilliertes Wasser
<b>Tab. 9</b> (S. 65):	Anzahl der Fehltritte der Tiere pro Versuchswoche
<b>Tab. 10</b> (S. 66):	Anzahl der Fehltritte pro Versuchswoche im Gruppenvergleich
<b>Tab. 11</b> (S. 67):	Maximale Kraft (g) der Tiere pro Versuchswoche
<b>Tab. 12</b> (S. 68):	Maximale Kraft (g) der Versuchsgruppe pro Versuchswoche im Seitenvergleich
<b>Tab. 13</b> (S. 69):	Maximale Kraft (g) der Kontrollgruppe pro Versuchswoche im Seitenvergleich
<b>Tab. 14</b> (S. 70):	Maximale Kraft (g) der operierten linken Seite pro Versuchswoche im Gruppenvergleich
<b>Tab. 15</b> (S. 71):	Bewegungsausmaß (Grad) der Tiere pro Versuchswoche
<b>Tab. 16</b> (S. 72):	Bewegungsausmaß (Grad) der operierten linken Seite pro Versuchswoche im Gruppenvergleich
<b>Tab. 17</b> (S. 73):	Gewichtsbestimmung (g) des M. deltoideus im Seitenvergleich
<b>Tab. 18</b> (S. 73):	Gewichtsbestimmung (g) des M. deltoideus im Seitenvergleich
<b>Tab. 19</b> (S. 74):	Abweichung (%) der Muskelmasse der Behandlungsgruppen im Seitenvergleich
<b>Tab. 20</b> (S. 74):	Abweichung (%) der Muskelmasse im Gruppenvergleich
<b>Tab. 21</b> (S. 75):	Differenzen des Muskelgewichts (g) im Gruppenvergleich
<b>Tab. 22</b> (S. 78):	Ausprägung der Kriterien in Grade



---

<b>Tab. 23</b> (S. 78):	Histologische Beurteilung des M. deltoideus der rechten Seite in Grade
<b>Tab. 24</b> (S. 78):	Ergebnisse der histologischen Untersuchung des M. deltoideus der rechten Seite
<b>Tab. 25</b> (S. 79):	Ergebnisse der histologischen Untersuchung der rechten Seite im Gruppenvergleich
<b>Tab. 26</b> (S. 80):	Ausprägung der Kriterien in Grade
<b>Tab. 27</b> (S. 80):	Histologische Beurteilung des M. deltoideus der linken Seite in Grade
<b>Tab. 28</b> (S. 80):	Ergebnisse der histologischen Untersuchung des M. deltoideus der linken Seite
<b>Tab. 29</b> (S. 81):	Ergebnisse der histologischen Untersuchung der linken Seite im Gruppenvergleich
<b>Tab. 30</b> (S. 84):	Ausprägung der Kriterien in Grade
<b>Tab. 31</b> (S. 84):	Histologische Beurteilung des Plexus brachialis der rechten Seite in Grade
<b>Tab. 32</b> (S. 84):	Ergebnisse der histologischen Untersuchung des Plexus brachialis der rechten Seite
<b>Tab. 33</b> (S. 85):	Ergebnisse der histologischen Untersuchung der rechten Seite im Gruppenvergleich
<b>Tab. 34</b> (S. 86):	Ausprägung der Kriterien in Grade
<b>Tab. 35</b> (S. 86):	Histologische Beurteilung des Plexus brachialis der linken Seite in Grade
<b>Tab. 36</b> (S. 86):	Ergebnisse der histologischen Untersuchung des Plexus brachialis der linken Seite
<b>Tab. 37</b> (S. 87):	Ergebnisse der histologischen Untersuchung der linken Seite im Gruppenvergleich
<b>Tab. 38</b> (S. 88):	Beschreibung und Behandlung der untersuchten Plexus
<b>Tab. 39</b> (S. 89):	Gewicht (g), VEGF-Konzentration (pg/g) und Proteingehalt (µg/g) der Präparate
<b>Tab. 40</b> (S. 89):	VEGF-Konzentration (pg/g) der Präparate in absteigender Reihenfolge

<b>Tab. 41</b> (S. 90):	VEGF-Konzentration (pg/g) der operierten linken Plexus im Gruppenvergleich
<b>Tab. 42</b> (S. 90):	VEGF-Konzentration (pg/g) der Plexus aus der Kontrollgruppe im Seitenvergleich
<b>Tab. 43</b> (S. 90):	Abweichung (%) der VEGF-Konzentration (pg/g) der operierten linken Plexus im Gruppenvergleich
<b>Tab. 44</b> (S. 93):	Ergebnisse der Zählung der Motoneurone in den Behandlungsgruppen
<b>Tab. 45</b> (S. 93):	Abweichung (%) der Anzahl der Motoneurone der Behandlungsgruppen im Seitenvergleich
<b>Tab. 46</b> (S. 93):	Abweichung (%) der Anzahl der Motoneurone im Gruppenvergleich
<b>Tab. 47</b> (S. 94):	Differenzen der Anzahl der Motoneurone im Gruppenvergleich

## 10. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
AAV	Adeno-assoziierte Viren
Abb.	Abbildung
AdCMV.VEGF <sub>165</sub>	E1A deletiertes Adenovirus Serotyp 5 kodierend für die VEGF-Isoform 165 mit einem konstitutiven Zytomegalievirus-Promotor
AG	Aktiengesellschaft
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
Ang	Angiopoetin
AP	Angina pectoris
BDNF	Brain-derived Neurotrophic Factor
Bp	Basenpaare
C	cervical
cDNA	komplementäre DNA

---

CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
$C_6H_5Na_3O_7$	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
$C_6H_8O_7$	Citronensäure
CMV	Cytomegalievirus
$CO_2$	Kohlendioxid
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii
Fa.	Firma
FGF	Fibroblast Growth Factors
Flk	Fetale Leberkinase
Flt	fms-like Tyrosinkinase
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HE	Hämatoxilin-Eosin
HIF	Hypoxia inducible Factor
HLA	humane Lymphozytenantigene
$H_2O$	Wasser
$H_2O_2$	Wasserstoffperoxid
HRE	hypoxia-responsive element
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
KAT-Studie	„Kuopio Angiogenesis Trial“-Studie
KCl	Kaliumchlorid
KDR	Kinase insert domain-containing receptor
KG	Kontrollgruppe
KG	Körpergewicht
$KH_2PO_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
M.	Musculus
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
$Na_2HPO_4$	Dinatriumhydrogenphosphat

NGF	Nerve Growth Factor
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
NRP	Neuropilin
NT	Neurotrophin
NTR	NT-Rezeptor
OP	Operation
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PIGF	Placental Growth Factor
PL	Plexus
PTA	perkutane transluminale Angioplastie
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
RAVE-Studie	„Regional Angiogenesis with VEGF“-Studie
REVASC-Studie	„Randomized Evaluation of VEGF for Angiogenesis in Severe Coronary Disease“-Studie
RNA	Ribonukleinsäure
s.c.	subcutan
SOD	Superoxiddismutase
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming Growth Factor
Th	thoracal
Tie	Tunica interna Endothelzell-Kinase
Trk	Tyrosinkinase
Trk-R	Trk-Rezeptor
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V.	Vena
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	VEGF-Rezeptor
VG	Versuchsgruppe
v-onc-Gene	virale Onkogene

---

## Einheiten:

Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
g	Gramm
h	Stunde
IU	Internationale Einheiten
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
λ	Wellenlänge
lx	Lux
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
pfU	plaquebildende Einheiten
pg	Pikogramm
rpm	Umdrehung pro Minute
s	Sekunde
V	Volumen
W	Watt
%	Prozent

## 11. Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. R. Giunta danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die gute Zusammenarbeit.

Mein großer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. T. Holzbach für die hervorragende Betreuung und die jederzeit gewährte Unterstützung in den vergangenen Jahren.

Herrn Prof. Dr. med. vet. K. Matiasek sowie den Medizinisch-technischen Assistenten der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich herzlich für die freundliche Zusammenarbeit.

Herrn Dr. rer. nat. A. Bergmann sowie Herrn Dr. med. A. Crispin vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Herzlich sei auch den Medizinisch-technischen Assistenten und Mitarbeitern des Tierbereichs der Technischen Universität München gedankt.

---

## Eidesstattliche Versicherung

Hillenbrand, Matthias

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Verbesserte Nervenregeneration durch adenovirale Gentherapie mit  
VEGF<sub>165</sub> im Modell der geburtstraumatischen Plexusparese an der Ratte**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Erlangen, 10.10.2014

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand